

Recenzja pracy doktorskiej mgr Anny Tylutki
z Katedry Fizjologii Stosowanej i Klinicznej
Collegium Medicum Uniwersytetu Zielonogórskiego pt.:
„Aktywny styl życia jako efektywna metoda profilaktyki
zaburzeń funkcji układu immunologicznego u osób starszych”

Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Od szeregu lat obserwuje się postępujący proces starzenia się społeczeństw poszczególnych krajów i wzrost odsetka osób w podeszłym wieku w strukturze ludności, w tym również Polski. Determinuje to w znacznym stopniu sytuację zdrowotną naszego Kraju. Skutkiem starzenia się jest m.in. zwiększona podatność na zakażenia. Przyczyn częstszego występowania infekcji u osób starszych należy szukać w zmianach odporności organizmu, które pojawiają się z wiekiem (immunosenescencja). Wpływa na to kilka elementów. Wraz z wiekiem całkowita liczba limfocytów T obniża się nieznacznie, natomiast zmienia się stosunek subpopulacji limfocytów CD 4+ i CD 8+. Obserwuje się też występującą wraz z wiekiem inwolucję grasicy - miejsce dojrzewania i różnicowania prekursorów komórek T. Skutkiem tego jest zmniejszona liczba limfocytów T dziewiczych. Zmiany związane z wiekiem dotyczą również limfocytów B, komórek NK (*ang. natural killer cells*), cytokin i innych elementów układu immunologicznego.

Konsekwencją tych zmian jest m.in. większa częstość infekcji wśród seniorów i często ich cięższy przebieg. Infekcje stanowią jeden z najważniejszych problemów zdrowotnych w starzejącym się społeczeństwie. Profilaktyka infekcji jest wielokierunkowa. Podstawowe znaczenie odgrywa wybór odpowiednich zachowań i stylu życia, szczególnie prawidłowe odżywianie się, systematyczna aktywność ruchowa i szczepienia przeciw grypie, zakażeniom

pneumokokowym i tężcowi. Regularna aktywność ruchowa wydaje się oddziaływać m.in. poprzez modulujący wpływ na związane z wiekiem zaburzenia funkcji układu immunologicznego. Dlatego też temat badań podjęty przez Doktorantkę należy uznać za bardzo ważny i aktualny.

Praca doktorska stanowi kompilację dwóch publikacji, jednej przeglądowej i jednej oryginalnej o łącznej wartości 4,191 Impact Factor i liczbie 140 punktów wg listy MEiN, pod wspólnym tytułem: „Aktywny styl życia jako efektywna metoda profilaktyki zaburzeń funkcji układu immunologicznego u osób starszych”:

Publikacja 1; Tylutka A, Zembron-Lacny A. Immunological aging and clinical consequences. *Postepy Hig Med Dosw* 2020; 74: 260-271. doi: 10.5604/01.3001.0014.3054.

Publikacja 2; Tylutka A, Morawin B, Gramacki A, Zembron-Lacny A. Lifestyle exercise attenuates immunosenescence; flow cytometry analysis. *BMC Geriatr* 2021; 21: 200. doi: 10.1186/s12877-021-02128-7.

Celem pierwszej pracy było dokonanie przeglądu literatury na temat immunosenescencji. Autorki opisują zmiany związane ze starzeniem się układu odpornościowego: obniżenie liczby dziewiczych limfocytów T i limfocytów B, aktywności cytotoksycznej komórek NK (*ang. natural killer cells*) oraz zaburzenia równowagi pro- i przeciwzapalnej poprzez zmiany wytwarzania takich cząsteczek, jak cytokiny IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF alfa czy INF gamma. Z wiekiem dochodzi do nasilenia autoimmunizacji i uogólnionego stanu zapalnego z jednoczesnym deficytem immunologicznym, co skutkuje większą podatnością na choroby infekcyjne, obniżeniem reaktywności na szczepienia profilaktyczne, zachorowalnością na choroby autoimmunologiczne, zwiększonym ryzykiem infekcyjnych powikłań urazów, zaostrzeniem objawów chorób przewlekłych oraz niedostateczną reakcją na obecność komórek nowotworowych. Od lat na podstawie analizy częstości zakażeń wirusowych i bakteryjnych, wskaźników immunologicznych i zapalenia podejmowane są próby opracowania profilu odpornościowego ryzyka (*ang. immune risk profile, IRP*) oraz efektywnych metod profilaktyki zaburzeń funkcji układu immunologicznego i przedłużenia sprawności funkcjonalnej osób starszych.

Celem drugiej pracy było dokonanie oceny profilu odpornościowego ryzyka na podstawie analizy cytometrycznej populacji limfocytów T w relacji do poziomu aktywności fizycznej. Rekrutacja objęła 99 osób w wieku od 60 do 90 lat. Na podstawie wywiadu

medycznego i kryteriów wykluczenia, badania zrealizowano z udziałem 54 osób w wieku $71,4 \pm 5,8$ lat (kobiety $n=47$, mężczyźni $n=7$). Uczestników podzielono na dwie grupy, aktywna i nieaktywna fizycznie, na podstawie wyniku 6-minutowego testu marszowego i submaksymalnej próby wysiłkowej. Do grupy aktywnej fizycznie włączono 34 osoby w wieku $70,2 \pm 5,8$ lat, których prędkość chodu wynosiła od 1,3 do 1,8 m/s i maksymalny poziom pobierania tlenu (ang. *maximal oxygen consumption*, VO_{2max}) wynosił >35 mL/kg/min. Do grupy nieaktywnej fizycznie włączono 20 osób w wieku $73,5 \pm 5,4$ lat, którzy osiągnęli prędkość chodu $<1,3$ m/s i wartość $VO_{2max} \leq 35$ mL/kg/min. Analizę subpopulacji limfocytów T dokonano za pomocą 8 parametrowego cytometru przepływowego i przeciwciał monoklonalnych znakowanych fluorochromami oraz immunofenotypowano określając odsetek limfocytów T dziewiczych i limfocytów T pamięci. Następnie przeprowadzono ocenę profilu ryzyka odpornościowego (ang. *immune risk profile*, IRP) na podstawie stosunku liczby limfocytów T $CD4^{+}$ do limfocytów T $CD8^{+}$ oraz miano przeciwciał IgG CMV (ang. *cytomegalovirus*, CMV). Wyliczono stosunek limfocytów T dziewiczych do limfocytów T pamięci w populacji $CD4^{+}$ i $CD8^{+}$ ($CD4CD45RA/CD4CD45RO$ oraz $CD8CD45RA/CD8CD45RO$). Przyjęto przedziały referencyjne stosunku $CD4/CD8$ między ≥ 1 a $\leq 2,5$ jako wartość prawidłową, podczas gdy wartości <1 lub $>2,5$ (odwrócony stosunek $CD4/CD8$ lub podwyższony stosunek $CD4/CD8$) uznano za fenotyp ryzyka immunologicznego. Ocenę zawartości tłuszczowej (ang. *fat mass*, FM) i beztłuszczowej masy ciała (ang. *free fat mass*, FFM) wykonano za pomocą analizatora składu ciała w oparciu o metodę impedancji bioelektrycznej (ang. *bioelectrical impedance analysis*, BIA).

Odsetek limfocytów T dziewiczych o fenotypie $CD4^{+}CD45RA^{+}$ i stosunek $CD4CD45RA/CD4CD45RO$ był istotnie wyższy u aktywnych fizycznie (prędkość chodu $1,5 \pm 0,1$ m/s) w porównaniu do nieaktywnych osób (prędkość chodu $1,0 \pm 0,1$ m/s). Analiza IRP wyrażona stosunkiem liczby limfocytów T pomocniczych $CD4^{+}$ do cytotoksycznych $CD8^{+}$, pokazała wartości w przedziale referencyjnym między ≥ 1 a $\leq 2,5$ u około 60% aktywnych fizycznie seniorów, podczas gdy odwrócony stosunek $CD4/CD8$ (wartości <1) obserwowano głównie w grupie nieaktywnych fizycznie. Osoby aktywne fizycznie charakteryzowały się obniżoną zawartością FM w porównaniu do osób nieaktywnych. Między FM a liczbą limfocytów T wykazano istotne zależności wyrażone współczynnikiem korelacji Spearmana ($FM/CD4^{+}$ $r_s=0,491$, $p<0,05$ i $FM/CD4^{+}CD45RO^{+}$ $r_s=0,636$, $p<0,01$) w grupie nieaktywnych fizycznie seniorów. Ze względu na wysoki odsetek osób seropozytywnych w badanej grupie (93%), nie potwierdzono związku zakażenia CMV ze zmianami stosunku $CD4/CD8$.

Na podstawie przeprowadzonych badań Doktorantka sformułowała następujące wnioski:

1. Aktywność fizyczna podejmowana przez całe życie (ang. *lifestyle exercise*) spowalnia immunosenescencję, a nawet „odmładza” układ immunologiczny: odsetek limfocytów T dziewiczych o fenotypie CD4+CD45RA+ i stosunek CD4CD45RA/CD4CD45RO były istotnie wyższe u aktywnych fizycznie (prędkość chodu $1,5 \pm 0,1$ m/s) w porównaniu do nieaktywnych osób (prędkość chodu $1,0 \pm 0,1$ m/s).
2. Aktywny styl życia istotnie wpływa na profil odpornościowego ryzyka IRP: stosunek CD4/CD8 w przedziale referencyjnym między ≥ 1 a $\leq 2,5$ stwierdzono u około 60% aktywnych fizycznie, podczas gdy odwrócony stosunek CD4/CD8 (wartości < 1) obserwowano głównie w grupie nieaktywnych fizycznie seniorów.
3. Niska aktywność fizyczna i wysoka zawartość tkanki tłuszczowej nasilają immunosenescencję i stwarzają szczególne ryzyko zaburzeń metabolicznych u osób starszych: zawartość tkanki tłuszczowej wysoko korelowała z liczbą CD4+ i CD4+CD45O+ w grupie nieaktywnych osób.

Badania zostały już opublikowane, niemniej jednak z pozycji recenzenta pozwolę sobie przedstawić kilka uwag:

- 1) Podział na grupy (aktywni vs nieaktywni fizycznie) odbył się na podstawie dwóch kryteriów: prędkości chodu z wartością graniczną 1,3 m/s i VO2max z punktem odcięcia 35 mL/kg/min. Czy wszyscy badani byli tak samo rozdzieleni przez te dwa kryteria? Jednocześnie w pracy oryginalnej pojawia się trzecie kryterium: kwestionariusz CHAMPS.
- 2) Grupy różniły się pod względem wieku, to mogło wpłynąć na wyniki.
- 3) Nie jest jasny skład obu grup w odniesieniu do płci. Korelacje z parametrami zależnymi od płci (np., % zawartość tkanki tłuszczowej) wymagają uwzględnienia tych różnic.
- 4) Badanie ma charakter przekrojowy; używanie takich pojęć jak „spowalnia”, „odmładza”, „wpływa”, „nasilają” nie powinno raczej być stosowane.

Pomimo powyższych uwag uważam, że materiał zebrany przez Doktorantkę oraz przedstawione wyniki stanowią istotny wkład w wiedzę na temat starzenia się immunologicznego. Na podstawie przeglądu literatury i przeprowadzonych badań Doktorantka wnioskuje, że utrzymanie aktywnego stylu życia może wzmacniać układ odpornościowy

poprzez zwiększenie odsetka populacji limfocytów T dziewiczych, a ocena obserwowanych wraz z wiekiem zmian liczby limfocytów T pomocniczych CD4+ do cytotoksycznych CD8+ może być istotna w prognozowaniu zaburzeń metabolicznych lub nasilenia objawów chorób współistniejących. Wyniki badań opublikowano w liczącym się czasopiśmie międzynarodowym.

Reasumując, w przedstawionej mi do recenzji pracy doktorskiej mgr Anna Tylutka wykazała się umiejętnością zdefiniowania bardzo ważnego i aktualnego problemu badawczego jakim jest współzależność aktywnego stylu życia i układu odpornościowego w starzejącym się organizmie.

Praca mgr Anny Tylutki spełnia warunki stawiane pracom doktorskim określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.). Wnoszę przeto do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. med. Tomasz Kostka



Łódź, 28 marzec 2022r.