

UNIWERSYTET MEDYCZNY W ŁODZI

Zakład Stomatologii Ogólnej

**AUTOREFERAT**

dr n. med. Natalia Lewkowicz

Łódź 2015

## **I. Dane osobowe**

Imię i nazwisko: Natalia Lewkowicz

Zajmowane stanowisko: Adiunkt

Miejsce pracy: Zakład Stomatologii Ogólnej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

## **II. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe**

- 1999 Dyplom lekarza stomatologa z wyróżnieniem, Akademia Medyczna w Łodzi, Wydział lekarski, Oddział Stomatologiczny
- 2002 Stopień dr n. med. z wyróżnieniem na podstawie rozprawy doktorskiej: "Badania nad udziałem neutrofilów krwi obwodowej w patogenezie aft nawrotowych", promotor Prof. dr hab. med. Anna Kurnatowska, Akademia Medyczna w Łodzi
- 2005 Tytuł specjalisty w dziedzinie stomatologii ogólnej
- 2009 Tytuł specjalisty w dziedzinie periodontologii

## **III. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych**

- 1999-2000 Staż podyplomowy w Instytucie Stomatologii Akademii Medycznej w Łodzi
- 2001 Poradnia Periodontologii i Chorób Błony Śluzowej Jamy Ustnej, Centralny Szpital Kliniczny Instytut Stomatologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
- 2003-2015 Zakład Periodontologii i Chorób Błony Śluzowej Jamy Ustnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, 06.2003-12.2007 asystent, od 01.2008 adiunkt
- 2015 Zakład Stomatologii Ogólnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, adiunkt

#### **IV. Podsumowanie dorobku naukowo-badawczego**

##### **Łączna punktacja za publikacje naukowe w czasopismach (bez suplementów)**

Impact Factor 32,933

Punktacja MNiSW 272,5

Index Copernicus 92,45

##### **w tym jako pierwszy autor**

Impact Factor 17,995

Punktacja MNiSW 144 punktów

Index Copernicus 61,82

##### **z wyłączeniem prac umieszczonych w dysertacji**

Impact Factor 14,456

Punktacja MNiSW 165,5 punktów

Index Copernicus 92,45

#### **V. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)**

##### **Tytuł osiągnięcia naukowego:**

„Regulacja neutrofilii i limfocytów T efektorowych przez limfocyty regulatorowe T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> u osób zdrowych i w wybranych patologich błony śluzowej jamy ustnej i przyzębia”

W skład osiągnięcia naukowego wchodzi cztery najważniejsze publikacje oryginalne dotyczące tego tematu o sumarycznym Impact Factor 18,477; MNiSW 109; indeks cytowań cyklu 131 (Scopus listopad 2015 r.).

**Autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa:**

1. Lewkowicz P, **Lewkowicz N**, Sasiak A, Tchórzewski H. Lipopolysaccharide-activated CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit neutrophil function and promote their apoptosis and death. **J. Immunol.** 2006; 177: 7155-7163.

IF 6,293; MNiSW 24

2. **Lewkowicz N**, Lewkowicz P, Dzitko K, Kur B, Tarkowski M, Kurnatowska A, Tchórzewski H.: Dysfunction of CD4+CD25high T regulatory cells in patients with recurrent aphthous stomatitis. **J. Oral Pathol. Med.** 2008; 37: 454–461.

IF 1,63; MNiSW 20

3. **Lewkowicz N**, Klink M, Mycko MP, Lewkowicz P. Neutrophil-CD4+CD25+ T regulatory cell interactions: a possible new mechanism of infectious tolerance. **Immunobiology.** 2013; 218: 455-64.

IF 3,18; MNiSW 25

4. **Lewkowicz N**, Mycko MP, Przygodzka P, Ćwiklińska H, Cichalewska M, Matysiak M, Selmaj K and Lewkowicz P. Induction of human IL-10-producing neutrophils by LPS-stimulated Treg cells and IL-10. **Mucosal Immunol.** 2015; doi: 10.1038/mi2015.66.

IF 7,374; MNiSW 40

Prace oryginalne wchodzących na opisu osiągnięcia naukowego były finansowane w ramach grantów: KBN N401 1569 33; KBN N402 444533; NCN 2014/13/B/NZ6/00235. Wszystkie badania posiadały odpowiednie Zgody Komisji Bioetycznych.

**Omówienie celu naukowego ww. pracy i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania**

W toku ewolucji ludzki organizm rozwinął szereg mechanizmów zapewniających eliminację patogenów. W chwili inwazji mikroorganizmów dochodzi do ich rozpoznania przez komórki immunokompetentne i zostaje uruchomiony złożony system odpowiedzi immunologicznej. Regulacja odpowiedzi zapalnej jest procesem niezwykle złożonym, odbywającym się na wielu poziomach reakcji immunologicznych. W zależności od rodzaju patogenu i poprawności funkcjonowania układu immunologicznego gospodarza zostają uruchomione złożone interakcje, które mogą prowadzić do różnych efektów klinicznych: eliminacji

zakażenia z pełną odbudową tkanek, eliminacji zakażenia z destrukcją tkanek otaczających, przetrwania czynnika infekcyjnego z przeciągającym się stanem zapalnym (zapalenie przewlekłe), kontroli czynnika infekcyjnego z zapoczątkowaniem nowej odpowiedzi immunologicznej (autoimmunizacja), oraz braku kontroli nad zakażeniem. Zaburzenie regulacji funkcji neutrofilii, głównych i najbardziej licznych komórek nieswoistej odpowiedzi immunologicznej, oraz efektorowych limfocytów T stanowi istotną przyczynę powikłań przewlekłych stanów zapalnych.

Limfocyty regulatorowe T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> (Treg) wydają się odgrywać kluczową rolę w aktywnej supresji odpowiedzi immunologicznej. Wykorzystują one różne mechanizmy prowadzące do hamowania odpowiedzi immunologicznej. Są zdolne do wytwarzania cytokin o działaniu przeciwzapalnym IL-10 i TGF-β, indukcji apoptozy komórek efektorowych, a także indukcji komórek tolerogennych (Bour-Jordan 2009). Po raz pierwszy subpopulacja limfocytów pomocniczych mająca zdolność hamowania funkcji innych komórek immunokompetentnych została opisana na początku lat siedemdziesiątych ubiegłego wieku przez profesorów Gershona, Kondo i Ptaka (Gershon & Kondo 1970, Gershon 1976). W kolejnych dekadach lat siedemdziesiątych i osiemdziesiątych XX wieku subpopulację tych komórek określano mianem limfocytów supresorowych, jednakże próby jej bliższego scharakteryzowania, zarówno pod względem fenotypowym, jak i funkcjonalnym napotykały duże trudności. Przełomem okazały się prace Sakaguchiego i wsp., którzy w 1995 roku odkryli, iż komórkami odpowiedzialnymi za hamowanie rozwoju autoimmunizacji u myszy są limfocyty T pomocnicze, które na swej powierzchni mają receptor dla łańcucha α IL-2 (CD25) (Sakaguchi 1995). Identyfikacja małej subpopulacji limfocytów T CD4<sup>+</sup> z konstytutywnie wysoką ekspresją receptora CD25 u ludzi była początkiem licznych badań nad oceną ich funkcji i znaczenia w patogenezie wielu chorób. Limfocyty Treg w wyniku bezpośrednich interakcji z innymi komórkami są zdolne do hamowania proliferacji w warunkach *in vitro* m.in.: limfocytów T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, monocytów i komórek dendrytycznych (Vignali 2008).

Mimo, że limfocyty Treg to mała populacja komórek, są one zdolne do sprawnego hamowania odpowiedzi immunologicznej dzięki tzw. *bystander suppression*. Oznacza to, że limfocyty Treg są aktywowane przez specyficzne dla danych limfocytów antygeny poprzez receptor limfocytów T (TCR), lecz tak aktywowane limfocyty działają supresyjnie w sposób niespecyficzny (Horowitz 2008). Dodatkowo, naturalne limfocyty Treg (*natural regulatory T cells* – nTreg) powstałe w grasicy są zdolne do indukcji limfocytów Treg *de novo* z limfocytów T naiwnych. Tak powstałe limfocyty Treg noszą miano nabytych (adaptive

Treg – aTreg), a proces nazywany jest tolerancją zaraźliwą (*infectious tolerance*) (Zheng 2004).

W swoich badaniach oceniałam funkcję limfocytów T regulatorowych CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> w warunkach *in vitro* w interakcjach z autologicznymi neutrofilami lub efektorowymi limfocytami CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> u osób zdrowych. Odkrycia dokonane w badaniach *in vitro* na komórkach pochodzących od zdrowych dawców potwierdzono następnie w badaniach na materiale pochodzącym od chorych z aftami nawracającymi, przewlekłym zapaleniem przyzębia oraz z chorobą Devica.

Najważniejsze odkrycie dotyczy supresorowego działania limfocytów Treg w stosunku do neutrofilii. Wykazałam, że hamują one wszystkie efektorowe funkcje neutrofilii i indukują ich apoptozę. Neutrofile po kontakcie z limfocytami Treg nabywają cech komórek supresorowych. Na podstawie wyników badań zaproponowałam istotne rozszerzenie teorii *infectious tolerance*. Wykazałam, że w zależności od rodzaju zapalenia i czynnika wywołującego limfocyty Treg w zróżnicowany sposób polaryzują neutrofile w kierunku komórek supresorowych. Limfocyty Treg aktywowane przez lipopolisacharyd (LPS) indukują w neutrofilach IL-10, która z kolei promuje polaryzację kolejnych neutrofilii w komórki wytwarzające IL-10 i ich apoptozę. Limfocyty Treg stymulowane poprzez receptor limfocytów T (TCR) indukują w neutrofilach mechanizmy zależne od enzymu rozkładającego tryptofan (indoleamine 2,3-dioxygenase; IDO), hemoksygenazę 1 (HO-1). Wcześniejsza ekspozycja neutrofilii na LPS całkowicie blokuje możliwość ich polaryzacji w kierunku komórek supresorowych, co może tłumaczyć patologiczne zaangażowanie neutrofilii w wielu stanach zapalnych. Poznanie genów biorących czynny udział w deaktywacji neutrofilii, stwarza nowe możliwości terapeutyczne, zarówno przy leczeniu pacjentów z sepsą wywołaną bakteriami Gram-ujemnymi, innych przewlekłych zapaleń wywołanych bakteriami Gram-ujemnymi, gdzie eradykacja patogenów jest utrudniona, jak i w aseptycznym zapaleniu, np. w chorobach autoimmunizacyjnych, czy też w chorobie nowotworowej, gdzie „przełamanie” środowiska uprzywilejowanego immunologicznie wywołanego naciekającymi nowotwór neutrofilami (TANs) może mieć kluczowe znaczenie.

**Publikacja pierwsza:** Lewkowicz P, Lewkowicz N, Sasiak A, Tchórzewski H. Lipopolysaccharide-activated CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells inhibit neutrophil function and promote their apoptosis and death. *J. Immunol.* 2006; 177: 7155-7163.

IF 6,293; MNiSW 24

Pierwszym osiągnięciem było wykazanie, że limfocyty Treg hamują wszystkie efektorowe funkcje neutrofilii, takie jak zdolność do adhezji, fagocytozy i produkcji reaktywnych form tlenu. Neutrofile po interakcji bezpośredniej komórka-komórka z limfocytami Treg stawały się komórkami apoptocznymi. Wyniki tych badań były zaskakujące z kilku względów. Po pierwsze, okazało się, że komórki ewolucyjnie młodsze (limfocyty Treg) mogą kontrolować funkcje komórek ewolucyjnie starszych (neutrofile). Po drugie, odkryliśmy, że limfocyty Treg posiadają na swojej powierzchni receptor Toll-like (TLR) 4, dla którego ligandem jest LPS pochodzący ze ścian komórkowych bakterii Gram-ujemnych. Funkcjonalnym dowodem na aktywny wpływ LPS na limfocyty Treg było wykazanie, że jądrowy czynnik transkrypcyjny FOXP3 ulega translokacji z cytozolu do jądra komórki podczas ekspozycji limfocytów Treg na LPS. Odkrycie tę pokazuje, że do aktywacji limfocytów Treg nie są konieczne antygeny prezentowane w kontekście MHC klasy II, a możliwa jest ich bezpośrednia aktywacja przez bakterie i ich toksyny. Indukcja odpowiedzi immunologicznej poprzez receptory TLR była dotychczas utożsamiana z aktywacją mechanizmów wrodzonych, a limfocyty Treg były postrzegane jako strażnik mechanizmów nabytych, odpowiedzialny głównie za hamowanie proliferacji i funkcji efektorowych limfocytów T.

Za odkrycie supresorowego działania limfocytów Treg w stosunku do neutrofilii oraz wykazania bezpośredniego wpływu LPS na limfocyty Treg, co może mieć znaczące konsekwencje w rozumieniu procesów regulacji zapalenia indukowanego bakteriami Gram-ujemnymi, otrzymałam wraz współautorami publikacji nagrodę Polskiego Towarzystwa Immunologii Klinicznej i Doświadczalnej na Zjeździe Towarzystwa w 2008 roku (Kraków 2008).

**Publikacja druga:** Lewkowicz N, Lewkowicz P, Dzitko K, Kur B, Tarkowski M, Kurnatowska A, Tchórzewski H.: Dysfunction of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T regulatory cells in patients with recurrent aphthous stomatitis. *J. Oral Pathol. Med.* 2008; 37: 454–461.

IF 1,63; MNiSW 20

Równolegle do badań nad fizjologicznymi aspektami interakcji neutrofile-limfocyty Treg prowadziłam badania nad regulacją limfocytów T efektorowych przez limfocyty Treg u chorych z aftami nawracającymi.

Afty nawracające (*recurrent aphthous ulcers* – RAU) to jedna z najczęściej występujących chorób błony śluzowej jamy ustnej o niewyjaśnionej etiologii. Afty nawracające mogą towarzyszyć niektórym chorobom ogólnoustrojowym, głównie o charakterze autozapalnym lub autoimmunologicznym, lub mogą występować bez uchwytnej przyczyny w obrębie innego układu. Taka idiopatyczna postać aft nawracających była przedmiotem moich badań naukowych. We wcześniejszych badaniach wykazałam, że u pacjentów z aftami nawracającymi występuje aktywacja obwodowych neutrofilii (Lewkowicz N. *et al.* *J. Oral Pathol. Med.* 2003; publikacja nie wchodząca na opisu osiągnięcia naukowego), jak również zaburzenie równowagi w wytwarzaniu cytokin pro- i przeciwzapalnych przez aktywowane komórki jednojądrzaste krwi obwodowej, oraz zmniejszenie odsetka obwodowych limfocytów Treg (Lewkowicz N. *et al.* *Immunol. Lett.* 2005; publikacja nie wchodząca na opisu osiągnięcia naukowego). Wyniki tych badań sugerowały, że obserwowana aktywacja neutrofilii, jak i przewaga wytwarzania cytokin prozapalnych przez komórki jednojądrzaste w aftach nawracających (zarówno w czasie aktywnych objawów chorobowych, jak i w okresach remisji) może być wynikiem dysfunkcji mechanizmów supresorowych, w tym limfocytów Treg, co stało się punktem wyjścia do przeprowadzenia tych badań.

W badaniach opublikowanych na łamach *Journal of Oral Pathology and Medicine* wykazałam zarówno zmniejszenie odsetka limfocytów Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3 we krwi obwodowej, jak również ich słabsze działanie supresorowe w stosunku do efektorowych limfocytów T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> u chorych z RAU w porównaniu do osób zdrowych. U chorych z aftami nawracającymi zahamowanie proliferacji efektorowych limfocytów T po stymulacji mitogenem było prawie dwukrotnie mniejsze w porównaniu do osób zdrowych. Limfocyty Treg ponadto mniej skutecznie hamowały wytwarzanie cytokin typu Th1 (INF- $\gamma$ , TNF, IL-2) przez limfocyty T efektorowe, zwłaszcza poziom wytwarzania TNF nie uległ zmniejszeniu.



Poziom wytwarzana cytokin typu Th2 IL-4 i IL-10 ulegał nawet zwiększeniu w hodowlach mieszanych limfocytów T u chorych z RAU. Niedostateczne hamowanie limfocytów T efektorowych może być także skutkiem ich oporności na działanie limfocytów Treg w obecności przewagi cytokin prozapalnych (Valencia 2006).

Jednym z mechanizmów działania limfocytów Treg jest indukcja enzymu degradującego tryptofan indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) w innych komórkach, a komórki dendrytyczne wytwarzające IDO promują powstawanie obwodowych limfocytów Treg z limfocytów T dziewiczych (Mellor 2005, Fallarino 2006). IDO jest wykrywany w skórze i błonie śluzowej zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i w wielu patologiach, gdzie poziom IDO wzrasta (Mellor 2004). Enzym ten jest uważany za ważny czynnik biorący udział w regulacji odpowiedzi immunologicznej w błonach śluzowych. W omawianych badaniach poddałam analizie poziom mRNA dla IDO w błonie śluzowej zmienionej chorobowo (afty), błonie śluzowej jamy ustnej klinicznie niezmięnionej u osób z RAU oraz błonie śluzowej osób zdrowych. Wykazałam mniejszą ekspresję IDO błonie śluzowej klinicznie niezmięnionej u osób z RAU w porównaniu do błony śluzowej osób zdrowych, a także wysoką ekspresję IDO w zmianach aftowych. Mniejsza konstytucyjna ekspresja IDO może być odpowiedzialna m.in. za zaburzenie powstawania obwodowych specyficznych antygenowo limfocytów Treg u chorych z aftami nawracającymi.

Podsumowując, zaburzenie liczebności i funkcji limfocytów Treg może być przyczyną nadreaktywności limfocytów Th1 i Th2 u chorych z aftami nawracającymi. Nadreaktywne populacje limfocytów T efektorowych mogą być ponadto mniej wrażliwe na działanie supresorowe limfocytów Treg, co konsekwencji może doprowadzić do reakcji zapalnej, niszczenia keratynocytów jamy ustnej i powstawania aft. Wadliwa funkcja limfocytów Treg może przekładać się również na niedostateczną kontrolę innych komórek immunokompetentnych w aftach nawracających. W swoich wcześniejszych badaniach wykazałam także, że neutrofile krwi obwodowej u pacjentów z RAU znajdują się w stanie preaktywacji i nadmiernie reagują na kolejny sygnał aktywujący (Lewkowicz 2003). Ten niebezpieczny z punktu widzenia homeostazy i równowagi oksydacyjnej stan może być także efektem dysfunkcji limfocytów Treg, które w niedostateczny sposób kontrolują funkcje i apoptozę neutrofilii.

**Publikacja trzecia:** Lewkowicz N, Klink M, Mycko MP, Lewkowicz P. Neutrophil-CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cell interactions: a possible new mechanism of infectious tolerance. *Immunobiology*. 2013; 218: 455-64.

IF 3,18; MNiSW 25

Limfocyty Treg swoje funkcje supresorowe spełniają w drodze bezpośredniego hamowania funkcji innych komórek immunokompetentnych, lub działają w sposób pośredni indukując właściwości supresorowe w innych komórkach. Odkrycie supresyjnego działania limfocytów Treg w stosunku do neutrofilii, a także możliwości aktywacji limfocytów Treg przez TLR4 stało się bodźcem do prowadzenia kolejnych badań. Postawiono dwa główne pytania badawcze:

1. Czy limfocyty Treg indukują w neutrofilach właściwości supresorowe?
2. Czy rodzaj aktywacji limfocytów Treg (LPS lub przeciwciała anti-CD3/CD28) przekłada się na odmienny sposób ich działania w stosunku do neutrofilii?

Nasze badania wykazały, że limfocyty Treg stymulowane LPS lub anti-CD3/CD28 miały zróżnicowane działanie w stosunku do autologicznych neutrofilii. Mianowicie, limfocyty Treg stymulowane LPS indukowały wytwarzanie przez neutrofile IL-10, cytokiny o działaniu przeciwzapalnym, a hamowały wytwarzanie IL-6, cytokiny o działaniu prozapalnym. Potwierdzono, że źródłem IL-10 w mieszanych inkubacjach są neutrofile, a nie limfocyty Treg, a synteza IL-10 została wykazana zarówno na poziomie wydzielania zewnątrzkomórkowego, wewnątrzkomórkowo, jak i na poziomie ekspresji mRNA. Jednym ze skutków wytwarzania IL-10 po interakcji limfocytów Treg z neutrofilami był wzrost ekspresji genu dla białka oraz aktywnej formy białka SOCS 3 (*cytokine-inducible SH2/suppressor of cytokine signaling*) w neutrofilach. Cząsteczki SOCS stanowią rodzinę wewnątrzkomórkowych białek odpowiedzialnych za negatywną regulację odpowiedzi komórek immunokompetentnych ekspozowanych na cytokiny prozapalne. Dlatego też indukcja ekspresji SOCS3 w neutrofilach może pełnić rolę konwertera sygnału z pro- na przeciwzapalny. Wzrost jej ekspresji powoduje niewrażliwość neutrofilii na sygnały cytokin prozapalnych i daje sygnał do wyciszenia zapalenia.

W swoich badaniach wykazaliśmy ponadto, że zarówno limfocyty Treg uprzednio aktywowane LPS, jak i mAb anti-CD3/CD28 zwiększają w neutrofilach zdolność do syntezy TGF-β1 (cytokiny o właściwościach przeciwzapalnych). W hodowlach neutrofilii z limfocytami Treg stymulowanymi LPS dochodziło do jednoczesowego wzrostu TGF-β1 i

spadku IL-6. Taki profil cytokin promuje wyciszenie zapalenia poprzez indukcję limfocytów Treg i zahamowanie polaryzacji limfocytów T dziewiczych w kierunku limfocytów Th17 (Kimura 2010).

Ze względu na to, że układ immunologiczny zawsze posiada alternatywne drogi zarówno aktywacji jak i deaktywacji odpowiedzi zapalnej, było wysoce prawdopodobne, że ingerencja limfocytów Treg w sieć cytokin wytwarzanych przez neutrofile nie jest jedynym mechanizmem oddziaływania na neutrofile. Dlatego też, zbadano zaangażowanie innych mechanizmów supresorowych z udziałem limfocytów Treg, które dotychczas były opisane na przykładzie innych komórek immunokompetentnych. Odkryliśmy, że limfocyty Treg aktywowane poprzez TCR indukują w neutrofilach enzym rozkładający tryptofan indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO). Jest to jeden z supresorowych mechanizmów, jakim posługują się limfocyty Treg, a proces ten zachodzi w trakcie bezpośredniej interakcji komórka-komórka przy udziale receptorów CTLA-4 na Treg i CD80/CD86 na neutrofilach. Zastosowanie przeciwciał neutralizujących receptor CTLA-4 powodowało zahamowanie indukcji tego enzymu, co dodatkowo potwierdziło funkcjonalne znaczenie interakcji CTLA-4 na limfocytach Treg z CD80/CD86 obecnymi na neutrofilach.

Kolejnym enzymem posiadającym właściwości ograniczenia zapalenia jest hemoksygenaza 1 (HO-1). Enzym ten odpowiedzialny jest za katabolizm hemu do biliwerdyny, a podczas tego procesu uwalniane są jony żelaza oraz tlenek węgla. Tlenek węgla dzięki możliwości swobodnego przemieszczenia się przez błony komórkowe wpływa na aktywność innych komórek układu immunologicznego, między innymi powoduje zahamowanie uwalniania cytokin prozapalnych przez makrofagi stymulowane LPS, hamowanie migracji komórek w miejsce zapalenia, proliferacji limfocytów T i syntezy cytokin prozapalnych (Pae 2004). Tlenek węgla powoduje także bezpośrednie zahamowanie chemotaksji, adhezji, diapedezy i produkcji reaktywnych form tlenu przez neutrofile (Freitas 2006.). Ze względu na to, iż neutrofile posiadają bogate źródło substratu dla HO-1 (cytochromy, oksydaza NADPH, syntetaza NO, katalazy, peroksydaza), a wzrost IDO koreluje ze wzrostem HO-1 w makrofagach (Oh 2004), poddaliśmy ocenie wpływ limfocytów Treg na poziom HO-1 w neutrofilach. Wykazaliśmy, iż po interakcji z aktywowanymi przez TCR limfocytami Treg w neutrofilach następuje indukcja HO-1, zarówno na poziomie mRNA, jak i wewnątrzkomórkowego białka. Jest to kolejny, równoległy do działania cytokin mechanizm odpowiedzialny za ograniczenie zapalenia i uszkodzenie komórek wynikający ze stresu oksydacyjnego związanego z aktywacją neutrofilei.

Nasze badania potwierdziły nadrzędną rolę limfocytów Treg w regulacji zapalenia i pozwoliły na szersze spojrzenie na kwestie jego regulacji w różnych jednostkach chorobowych. A mianowicie, w przypadku aktywacji Treg przez TCR z komórkami prezentującymi antygeny obce lub własne w kontekście MHC, oddziałują one na neutrofile indukując w nich syntezę TGF- $\beta$ 1,IDO i HO-1. Brak w tryptofanu w środowisku jest przyczyną autofagii, głównie komórek dojrzewających i proliferujących, np. limfocytów. Ma to szczególne znaczenie w przypadku eliminacji autoreaktywnych limfocytów w chorobie autoimmunizacyjnej (zapalenie aseptyczne). Natomiast w sytuacji silnej aktywacji, np. podczas infekcji bakteriami Gram-ujemnymi, reakcja hamowania zapalenia odbywa się za pośrednictwem wytwarzania i uwalnianych przez neutrofile do środowiska cytokin przeciwzapalnych IL-10 i TGF- $\beta$ 1. Obie cytokiny posiadają szerokie spektrum działania przeciwzapalnego, m.in. hamując proliferację komórek immunokompetentnych, wytwarzanie cytokin typu Th1, funkcje komórek prezentujących antygen, ekspresję MHC II, oraz tworzenia synapsy immunologicznej przez CD80/CD86.

Opisane wyniki w zestawieniu z wcześniejszymi naszymi publikacjami pozwoliło nam na sformułowanie własnej hipotezy regulacji zapalenia. Po raz pierwszy teoria ta została zaprezentowana na XVI Zjeździe Polskiego Towarzystwa Immunologii Klinicznej i Doświadczalnej w Gdańsku 18 czerwca 2011 roku na sesji poświęconej neutrofilom. Dwa lata później nasz model regulacji zapalenia opisaliśmy na łamach *Immunobiology*

Zaproponowane w niniejszej publikacji rozszerzenie teorii '*infectious tolerance*' zostało potwierdzone klinicznie w badaniach nad patogenezą nowotworów jako możliwy mechanizm tworzenia środowiska uprzywilejowanego immunologicznie wokół komórek nowotworowych (przykładowe cytowanie: Mishalian 2014). Zarówno indukowane przez limfocyty Treg supresorowe neutrofile, jak i limfocyty Treg rekrutowane przez neutrofile okalające komórki nowotworowe (tumor-associated neutrophils; TANs) i wydzielające chemokinę CCL17 (czynnik chemotaktyczny dla limfocytów Treg), mogą stanowić swoisty rodzaj „kurtyny” ochronnej komórek nowotworowych przed eliminacją komórkami układu immunologicznego.

**Publikacja czwarta:** Lewkowicz N, Mycko MP, Przygodzka P, Ćwiklińska H, Cichalewska M, Matysiak M, Selmaj K and Lewkowicz P. Induction of human IL-10-producing neutrophils by LPS-stimulated Treg cells and IL-10. *Mucosal Immunol.* 2015. doi: 10.1038/mi2015.66.  
 IF 7,374; MNiSW 40

Główny zarys teorii regulacji zapalenia z udziałem aktywowanych limfocytów Treg i neutrofilii opublikowanej na łamach *Immunobiology* wymagał doprecyzowania. W kolejnym projekcie badawczym skupiliśmy się na poznaniu szczegółowych mechanizmów działania limfocytów Treg stymulowanych LPS w stosunku do neutrofilii. Jednym z najważniejszych aspektów było wyjaśnienie kwestii dominacji ilościowej neutrofilii, w stosunku do limfocytów Treg w miejscu objętym zapaleniem. Szacowane proporcje limfocytów Treg i neutrofilii we krwi obwodowej to 1:150 - bezwzględna wartość limfocytów T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP<sup>+</sup> to 10-60 komórek/ $\mu$ L, podczas gdy neutrofilii 1500-8000 komórek/ $\mu$ L. W miejscu objętym zapaleniem różnice te są jeszcze większe. Wstępne eksperymenty wykazały, iż do wytwarzania IL-10 i indukcji apoptozy neutrofilii wymagana jest interakcja fizyczna obu populacji. Zablokowanie tworzenia synapsy immunologicznej *via* ICAM1-CD11b powoduje zniesienie indukcji wytwarzania IL-10 przez neutrofile. Niemniej jednak, analiza przyżyciowa interakcji międzykomórkowych zobrażowana w mikroskopie Nomarskiego uwidoczniała, że jeden limfocyt Treg tworzy synapsę immunologiczną zaledwie z dwoma neutrofilami w ciągu 7 godzin przy proporcjach komórek Treg:neutrofil 1:50. Kontrastowało to z obrazowaniem immunocytochemicznym (ICC) szerokiego pola widzenia w mieszanych hodowlach, gdzie już po 5 godzinach inkubacji ponad 60% neutrofilii wytwarzało IL-10. Poddano weryfikacji hipotezę o parakrynnym działaniu IL-10 produkowanej przez neutrofile, która indukuje wytwarzanie IL-10 przez kolejne neutrofile. W cyklu eksperymentów stosując przeciwciała blokujące IL-10, egzogenną rekombinowaną ludzką IL-10, inkubacje z rozdzieleniem neutrofilii i limfocytów Treg przez inserty typu „transwell” wykazaliśmy, że w pierwszym etapie po interakcji z aktywowanymi LPS limfocytami Treg neutrofile stają się komórkami produkującymi IL-10, która w drugim etapie polaryzuje pozostałe neutrofile w kierunku komórek produkujących IL-10. Opisany proces jest jednym z niewielu przykładów dodatniego sprzężenia zwrotnego u ludzi.

Innym aspektem koniecznym do rozważenia było wyjaśnienie kwestii apoptozy neutrofilii. Odsetek komórek apoptotycznych korelował z podobnym odsetkiem neutrofilii

produkujących IL-10, co wskazywało że oba te procesy występują jednocześnie. W badaniach w barwieniu trykolorowym techniką ICC (Aneksyna V, IL-10 i DNA) wykazaliśmy, iż neutrofile wytwarzające IL-10 wykazują cechy komórek apoptotycznych (wysoka ekspresja fosfatydyloseryny na zewnętrznej stronie błony komórkowej). W kolejnych badaniach scharakteryzowaliśmy rodzaj apoptozy, wskazując że limfocyty Treg aktywowane *via* LPS indukują drogę mitochondrialną apoptozy w neutrofilach.

Kluczowym elementem w indukcji supresorowych neutrofilii okazała się metylacja białka histonowego H3 w regionie K4, aktywująca transkrypcję genu promotorowego dla IL-10. Tak istotna reorganizacja chromatyny w neutrofilach jest możliwa, najprawdopodobniej dzięki specyficznej morfologii komórki. Neutrofile są komórkami krótko żyjącymi (8-21 godzin), w stadium dojrzałym charakteryzują się jądrem podzielonym o dość luźnej chromatynie, co ułatwia jej reorganizację i dostęp do genów dla jądrowych czynników transkrypcyjnych w krótkim czasie. Taki obraz jest nietypowy dla pozostałych, długożyjących komórek układu immunologicznego będących w stadium spoczynkowym, które do swej aktywacji i rozluźnienia chromatyny wymagają dłuższego czasu (np. transformacja blastyczna w przypadku limfocytów to około 21 godzin). Warty podkreślenia jest odkrycie, że wcześniejsza ekspozycja neutrofilii na LPS całkowicie blokuje możliwość metylacji białka histonowego H3 w regionie K4 i tym samym polaryzacji neutrofilii w kierunku supresorowych komórek wytwarzających IL-10.

Ostatni cykl eksperymentów podsumowujący badania polegał na potwierdzeniu, że obserwowane interakcje pomiędzy neutrofilami i stymulowanymi LPS limfocytami Treg nie są jedynie sztucznym układem izolowanych subpopulacji działającym tylko *in vitro*, a mają swoje odzwierciedlenie *in vivo* w miejscu zapalenia. W eksperymencie zastosowaliśmy obrazowane ICC dwukolorowe IL-10 i FOXP3 w materiale pobranym od chorych z przewlekłym zapaleniem przyzębia (wysiłek ropny z kieszonek patologicznych) oraz od pacjentów z chorobą Devica (płyn mózgowo-rdzeniowy). Przewlekłe zapalenie przyzębia jest chorobą wywołaną przez bakterie Gram-ujemne, a choroba Devica (*Neuromyelitis optica*) jest przykładem przewlekłego aseptycznego zapalenia ośrodkowego układu nerwowego. Badanie potwierdziło, że u osób z przewlekłym zapaleniem przyzębia większość neutrofilii obecnych w wysięku zapalnym wytwarzało IL-10, podczas gdy u pacjentów z aseptycznym zapaleniem żaden z obecnych w polu widzenia neutrofilii nie wytwarzał IL-10. W materiale z obu typów zapalenia były natomiast obecne limfocyty Treg (FOXP3), co stanowi dodatkowy, pośredni dowód o interakcjach obu subpopulacji komórek w miejscu zapalenia.



## Perspektywy praktycznego wykorzystania odkrycia

Odkrycie nowego mechanizmu regulacji zapalenia indukowanego bakteriami Gram-ujemnymi może mieć duże konsekwencje kliniczne. Poznanie tego mechanizmu pozwala na lepsze zrozumienie przebiegu zarówno przewlekłych stanów zapalnych, w których trwała eradykacja patogenów jest utrudniona bądź niemożliwa z powodu nieskutecznej odpowiedzi immunologicznej gospodarza (przewlekłe zapalenie przyzębia, zakażenie *Candida*, zakażenie *Helicobacter pylori*), jak i patomechanizmu nowotworów, w których zmienione komórki unikają eliminacji ze względu na nieskuteczne działanie immunokompetentnych komórek efektorowych. Na drugim biegunie są schorzenia, w których neutrofile są patologicznie aktywne (afty nawracające, reumatoidalne zapalenie stawów, choroba Devica), a zaburzenie deaktywacji neutrofilii może stanowić istotną przyczynę powikłań. Uzyskane wyniki mogą być w przyszłości wykorzystane do opracowania skutecznego sposobu na odblokowanie lub wymuszoną aktywację genów związanych z polaryzacją neutrofilii w kierunku komórek supresorowych. Wskazanie potencjalnych celów terapii może mieć praktyczne znaczenie w projektowaniu celowanej (farmakologiczna modulacja linii mieloidalnej), wysoce swoistej terapii genowej (np. siRNA, lub krótkich sekwencji palindromowych CRISPR). Swoista ingerencja w genom komórek mielopoetycy może przyspieszyć lub zahamować powstawanie supresorowych neutrofilii i tym samym pozwolić na skuteczniejsze działanie konwencjonalnej terapii. Obecnie przestąpiliśmy do realizacji tej koncepcji w ramach projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (OPUS 9: 2015/17/B/NZ6/04251: „Poszukiwanie genów związanych z białkiem histonowym H3K4me3 odpowiedzialnych za polaryzację neutrofilii w kierunku komórek supresorowych w stanach zapalnych trudno poddających się leczeniu”), w którym zamierzam wskazać promotory genów odpowiedzialnych za zmianę polaryzacji neutrofilii z komórek pro- na przeciwzapalne oraz określić ścieżki przekazywania komórkowego przez nie uruchomiane.

## Piśmiennictwo

- [1] Bour-Jordan H, Bluestone JA. Regulating the regulators: costimulatory signals control the homeostasis and function of regulatory T cells. *Immunol Rev* 2009; 229: 41–66.
- [2] Fallarino F, Grohmann U, You S, et al. Tryptophan catabolism generates autoimmune-preventive regulatory T cells. *Transpl Immunol* 2006; 17: 58–60.
- [3] Freitas A, Alves-Filho JC, Secco DD, Neto AF, Ferreira SH, Barja-Fidalgo C, Cunha FQ. Heme oxygenase/carbon monoxide-biliverdin pathway down-regulates neutrophil rolling, adhesion and migration in acute inflammation. *Br J Pharmacol.* 2006; 149: 345–354.
- [4] Gershon RK & Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* 1970; 18: 723-737.
- [5] Gershon RK, Eardley DD, Ptak W. Functional inactivation of suppressor T cells by heat-killed macrophages. *Nature* 1976; 262: 216–217.
- [6] Horwitz DA, Zheng SG, Gray JD. Natural and TGF-beta-induced Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells are not mirror images of each other. *Trends Immunol* 2008; 29: 429-435.
- [7] Kimura A, Kishimoto T. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur J Immunol.* 2010; 40: 1830–1835.
- [8] Mellor A. Indoleamine 2,3 dioxygenase and regulation of T cell immunity. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 338: 20–4.
- [9] Mellor AL, Munn DH. IDO expression in dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 762–74.
- [10] Mishalian I, Bayuh R, Eruslanov E, Michaeli J, Levy L, Zolotarov L, Singhal S, Albelda SM, Granot Z and Fridlender ZG. Neutrophils recruit regulatory T-cells into tumors via secretion of CCL17—A new mechanism of impaired antitumor immunity. *Intern J Cancer.* 2014; 135: 1178-1186.
- [11] Oh GS, Pae HO, Choi BM, Chae SC, Lee HS, Ryu DG, Chung HT. 3-Hydroxyanthranilic acid, one of metabolites of tryptophan via indoleamine 2,3 dioxygenase pathway, suppresses inducible nitric oxide synthase expression by enhancing heme oxygenase-1 expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 320: 1156–1162.



- [12] Pae HO, Oh GS, Choi BM, Chae SC, Kim YM, Chung KR, Chung HT. Carbon monoxide produced by heme oxygenase-1 suppresses T cell proliferation via inhibition of IL-2 production. *J Immunol*. 2004; 172: 4744–4751.
- [13] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Pillars article: immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor  $\alpha$  chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155: 1151–1164.
- [14] Valencia X, Stephens G, Goldbach-Mansky R, Wilson M, Shevach EM, Lipsky PE. TNF downmodulates the function of human CD4CD25<sup>high</sup> T-regulatory cells. *Blood* 2006; 108: 253–261.
- [15] Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 523–532.
- [16] Zheng SG, Wang JH, Gray JD, Soucier H, Horwitz DA. Natural and induced CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells educate CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> cells to develop suppressive activity: the role of IL-2, TGF- $\beta$ , and IL-10. *J Immunol* 2004; 172: 5213–5221.

## VI. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

### 1. Immunologiczne aspekty patogenezы aft nawracających jamy ustnej

Zasadniczym kierunkiem moich zainteresowań naukowych i lekarskich są problemy patogenezы i leczenia chorób błony śluzowej jamy ustnej, a w szczególności aft nawracających jamy ustnej (recurrent aphthous ulcers – RAU). Temu zagadnieniu poświęcono 9 prac. Nawracające nadżerki i owrzodzenia błony śluzowej jamy ustnej są często spotykanymi zmianami w praktyce lekarza dentysty. Zmiany te są zwykle bolesne i często utrudniają przyjmowanie pokarmów i mówienie. Afty nawracające są jednym z najczęściej diagnozowanych stanów charakteryzujących się nawrotowym występowaniem nadżerek i owrzodzeń w jamie ustnej. Objawy kliniczne z aft nawracających są niejednorodne (różne typy zmian, zróżnicowane nasilenie choroby), a etiologia jest niewyjaśniona. Nie są znane obiektywne kryteria definitywnie rozstrzygające rozpoznanie aft nawracających, a opisowe kryteria nie są dobrze zdefiniowane. Większość przypadków aft nawracających jest uznawana za idiopatyczne, lecz niektóre mogą być związane z chorobami ogólnoustrojowymi, takimi jak niedobory hematologiczne czy choroby zapalne. Leczenie aft nawracających jest mało skuteczne.

Wykazałam, że u podłoża aft nawracających leży nadreaktywność układu immunologicznego, zarówno odporności wrodzonej, jak i nabytej. Cechy aktywacji neutrofilii krwi obwodowej i układu dopełniacza były stwierdzone nie tylko w fazie aktywnej choroby, lecz również w fazie remisji. Neutrofile krwi obwodowej chorych z RAU świeżo izolowane lub stymulowane fMLP wytwarzały zwiększone ilości reaktywnych form tlenu oraz charakteryzowały się większą ekspresją cząsteczki adhezyjnej CD11b. Preinkubacja neutrofilii z TNF nie wywołała u chorych efektu preaktywacji. Towarzyszyła temu obniżona pojemność antyoksydacyjna surowicy. Poziomy składowych C3c i C4, a także aktywność hemolityczna dopełniacza były znacząco wyższe u chorych z RAU w porównaniu do osób zdrowych.

Kolejne badania nad patogenezą aft nawracających były realizowane w ramach projektów badawczych KBN pt. „Udział mechanizmów autoimmunizacyjnych w patogenezie aft nawracających” i „Udział mechanizmów autoimmunizacyjnych w patogenezie aft nawracających - rola limfocytów T efektorowych CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> oraz regulatorowych CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>”. W ramach tych badań wykazałam, że u większości przebadanych pacjentów z aftami nawracającymi występują autoprzeciwciała skierowane przeciwko desmosomom

warstwy kolczystej nabłonka wielowarstwowego płaskiego we krwi w fazie aktywnej choroby. Ponadto komórki jednojądrzaste krwi obwodowej (PBMC) chorych z RAU wytwarzają zwiększone ilości cytokin typu Th1: IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF, a zmniejszoną ilość cytokin o działaniu supresyjnym IL-10 i TGF- $\beta$ . Podobny profil wytwarzanych cytokin był wykazany zarówno w fazie aktywnej, jak i w fazie bezobjawowej choroby.

Kolejne badania nad patogenezą aft nawracających nakierowane były na wyjaśnienie uprzednio opisanych zjawisk na poziomie biologii komórki. Postęp biotechnologiczny umożliwia uzyskanie dużej ilości informacji na poziomie komórkowym, co przekłada się na bardziej szczegółowe zrozumienie patogenetycznych zależności przyczynowo-skutkowych. Przeprowadziłam badania nad ekspresją genów w błonie śluzowej jamy ustnej chorych z aftami nawracającymi (zmienionej chorobowo). Wykazałam na poziomie ekspresji genów, że w nacieku zapalnym wokół nadżerek aftowych wiodącą rolę odgrywają mechanizmy zapalne zależne od limfocytów Th1, podczas gdy geny charakterystyczne dla odpowiedzi typu Th2, Th3 czy Th17 nie ulegają ekspresji.

W przeprowadzonych przeze mnie badaniach nad patogenezą aft nawracających wykazałam, że wiele elementów odpowiedzi immunologicznej u chorych z RAU charakteryzuje zwiększona reaktywność, nie wykazano natomiast cech mogących świadczyć o niedoborach immunologicznych. Wyniki tych badań wskazują na bezzasadność stosowania leczenia immunostymulującego w aftach nawracających i konieczność poszukiwania bezpiecznych, adekwatnych do nasilenia choroby leków przeciwzapalnych/immunosupresyjnych.

**1. Gurańska N, Urbaniak B, Lewkowicz P, Tchórzewski H.:** Afty nawrotowe: etiologia ze szczególnym uwzględnieniem teorii immunologicznych. Pol. Merk. Lek. 2000; 44: 113-117.

MNiSW 5

**2. Gurańska N, Urbaniak B, Lewkowicz P, Tchórzewski.:** Afty nawrotowe: rozpoznanie i leczenie. Czas. Stomat. 2001; 54: 102-110.

MNiSW 5

**3. Lewkowicz N, Kurnatowska A, Lewkowicz P, Banasik M, Tchórzewski H.:** Rola neutrofilii krwi obwodowej w patogenezie aft nawrotowych. Dent. Med. Probl. 2002; 39: 69-77.

MNiSW 2

**4. Lewkowicz N,** Lewkowicz P, Kurnatowska A, Banasik M, Głowacka E, Cedzyński M, Świerzko A, Lauk-Puchała B and Tchórzewski H.: Innate immune system is implicated in recurrent aphthous ulcer pathogenesis. *J. Oral. Pathol. Med.* 2003; 32: 475-81.

IF 0,969; MNiSW 8

**5. Lewkowicz N,** Tchórzewski H, Kurnatowska A, Lewkowicz P.: Obecność autooprzeciwciał przeciw desmosomom u chorych z aftami nawracającymi. *Dent. Med. Probl.* 2004; 41: 661-669.

MNiSW 2

**6. Lewkowicz N,** Banasik M, Tchórzewski H, Kurnatowska A, Lewkowicz P.: Przewaga wytwarzania cytokin typu Th1 u chorych z aftami nawracającymi. *Dent. Med. Probl.* 2004; 41: 655-660.

MNiSW 2

**7. Lewkowicz N,** Lewkowicz P, Banasik M, Kurnatowska A, Tchórzewski H.: Predominance of type 1 cytokines and decreased number of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T regulatory cells in peripheral blood of patients with recurrent aphthous ulcerations. *Immunol. Lett.* 2005 V.99: 57-62.

IF 2,301; MNiSW 20

**8. Lewkowicz N,** Kur B, Kurnatowska A, Tchórzewski H, Lewkowicz P. Expression of Th1/Th2/Th3/Th17-related genes in recurrent aphthous ulcers. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 2011; 59: 399-406.

IF 2,541; MNiSW 20

**9. Lewkowicz N.** Recurrent aphthous stomatitis – a reflection of gastrointestinal diseases? *Dent. Med. Probl.* 2015; 52: 472-478.

MNiSW 5

## **2. Regulacja zapalenia, w szczególności funkcji neutrofilii i limfocytów T regulatorowych**

W kręgu moich zainteresowań naukowych są również mechanizmy regulujące procesem wrodzonej odporności organizmu, a w szczególności funkcji neutrofilii. Pracę naukową dotyczącą tego tematu prowadziłam pod kierownictwem profesora Henryka Tchórzewskiego

(Zakład Immunologii Klinicznej, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi). W projekcie badawczym z tego zakresu wykazaliśmy, wbrew wcześniejszym poglądom, że neutrofile posiadają na swojej powierzchni receptor dla naskórkowego czynnika wzrostu (EGF) i ulegają preaktywacji podczas ekspozycji na EGF. Ta oryginalna obserwacja wskazuje na złożoność mechanizmów prowadzących do aktywacji neutrofilii i ujawnia nieoczekiwaną rolę EGF, który nie tylko bierze udział w procesie remodelingu naczyń i naprawie pozapalnej tkanek, ale także może uczestniczyć we wczesnej fazie zapalenia. Jak pokazuje analiza bibliograficzna cytowań tej publikacji, odkrycie to było istotne w kontekście rozumienia złożonych interakcji immunologicznych w procesie miażdżycy naczyń, unaczynieniu guzów nowotworowych, jak i aktywacji neutrofilii w kolebce maziowej osób z reumatoidalnym zapaleniem stawów. Wybrane przykłady cytowań: **1.** *Current Immunology Reviews* 2006, 2: 247. **2.** *Journal of Hypertension* 2007, 25: 2249. **3.** *American Journal of Pathology* 2008, 173: 205. **4.** *Lung Cancer* 2013, 80: 344. **5.** *Cancer Treatment Reviews* 2014, 40: 1221.

W tym samym czasie rozpoczęłam pracę nad analizą roli limfocytów regulatorowych T CD4+CD25+ w aspekcie odporności nieswoistej i swoistej, a także ich roli w patogenezie chorób autoimmunologicznym i autozapalny, co zaowocowało powstaniem dwóch prac poglądowych z tego tematu.

1. Lewkowicz P, Tchórzewski H, Dytnerska K, Banasik M, **Lewkowicz N.**: Epidermal growth factor enhances TNF- $\alpha$ -induced priming of human neutrophils. *Immunol. Lett.* 2005; V.96: 203-210.

IF 2,301; MNiSW 20

2. Lewkowicz P, **Lewkowicz N**, Tchórzewski H.: Limfocyty T regulatorowe CD4+CD25+: Fizjologia i rola tych komórek w modulowaniu odpowiedzi immunologicznej. *Post. Hig. Med. Doświadc.* 2005; T.59: 362-370.

MNiSW 5.

3. Lewkowicz P, **Lewkowicz N**, Tchórzewski H.: Limfocyty regulatorowe CD4+CD25+ w patofizjologii i terapii chorób o podłożu immunologicznym. *Post. Hig. Med. Doświadc.* 2005; T.59: 371-376.

MNiSW 5

### 3. Immunomodulujące właściwości oleju rybiego zawierającego alkiloglicerole i skwalen

Kolejnym kierunkiem prowadzonych przeze mnie badań była ocena immunomodulujących właściwości olejów rybich zawierających alkiloglicerole i skwalen. Temu zagadnieniu poświęcono dwie prace pogładowe i trzy prace kliniczne. W badaniach klinicznych wykazałam ze współautorami przydatność stosowania oleju rybiego we wspomaganiu leczenia aft nawracających jamy ustnej i nawracających infekcji bakteryjnych górnych dróg oddechowych. Kontynuacją tych badań była również praca, w której wraz ze współautorami oceniono wpływ oleju rybiego na czynność układu immunologicznego u osób zdrowych. Wykazaliśmy, że oleje z wątroby rekina przyjmowane w dużych dawkach są silnymi stymulatorami nieswoistej odpowiedzi immunologicznej i promotorami polaryzacji limfocytów w kierunku Th1.

1. **Gurańska N**, Lewkowicz P, Urbaniak B, Banasik M, Głowacka E, Lauk-Puchała B, Peterson R, Tchórzewski H.: Ocena skuteczności leczenia aft nawrotowych olejem z wątroby rekina w aspekcie badań klinicznych i immunologicznych. *Pol. Merk. Lek.* 2001; 11: 233-238.

MNiSW 5

2. Lewkowicz P, **Gurańska N**, Tchórzewski H.: Immunomodulujące właściwości preparatu z wątroby rekina. *Prob. Ter. Monit.* 2001, 12: 189-195.

MNiSW 0,5

3. Lewkowicz P, **Lewkowicz N**, Głowacka E, Banasik M, Tchórzewski H.: Rola alkilogliceroli, skwalenu i wielonienasyconych kwasów omega 3 w zwalczaniu infekcji bakteryjnych: modyfikacja naturalnych (wrodzonych) mechanizmów odporności. *Probl. Ter. Monit.* 2002; 13: 163-169.

MNiSW 1

4. Lewkowicz P, Banasik M, Głowacka E, **Lewkowicz N**, Tchórzewski H.: Modyfikujący wpływ dużych dawek preparatu oleju z wątroby rekina na polaryzację limfocytów T i funkcję neutrofilii krwi. *Pol. Merk. Lek.*, 2005; 108, 686-692.

MNiSW 5

5. **Lewkowicz N**, Lewkowicz P, Kurnatowska A, Tchórzewski H. Biological action and clinical application of shark liver oil. *Pol. Merk. Lek.* 2006; 20: 598-601.

MNiSW 5

#### **4. Molekularne podłoże immunopatogenezy modelu zwierzęcego stwardnienia rozsianego**

Ostatnie lata w nauce to złota era genetyki i mechanizmów regulacji posttranskrypcyjnej białek. Wzięłam udział w projekcie dotyczącym patogenezy stwardnienia rozsianego pod naukowym kierunkiem profesora Krzysztofa Selmaja (Zakład Neurologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi). Współuczestniczyłam w analizie ekspresji mikro RNA (miRNA) i białek regulujących odpowiedzialnych za dojrzewanie prekursorów oligodendrocytów i komórek układu immunologicznego naciekających mózg na modelu zwierzęcym stwardnienia rozsianego. Niekodujące cząsteczki RNA, miRNA, regulują ekspresję genów na drodze interferencji RNA. Odbywa się to na zasadzie komplementarności sekwencji pomiędzy cząsteczką regulatorową i mRNA genu docelowego. miRNA rozpoznają i wiążą obszar 3' UTR transkryptu, co prowadzi do zatrzymania procesu translacji. Ostatnio wykazano także, że miRNA może wzmacniać translację, a proces ten zależny jest od białka FXR1 w kompleksie z Ago2. Proces wyciszania/wzmacniania ma miejsce w kompleksie białkowym RISC (*RNA induced silencing complex*) o aktywności specyficznej nukleazy, którego aktywność enzymatyczna jest uzależniona od wielu czynników.

W naszych badaniach odnotowaliśmy zmniejszoną ekspresję białek odpowiedzialnych za procesowanie miRNA w cytoplazmie oligodendrocytów: Ago2 i FXR1, GW182. Białka te wchodzi w skład kompleksu białkowego regulowanego zarówno przez poziom wewnątrzkomórkowy całkowitej puli miRNA, jak i przez czynniki zewnętrzne *via* fosforylacja Ago2 w regionie Y529. Zaburzenie formowania kompleksu RISC ma wpływ na całą pulę różnorodnych cząsteczek miRNA. Dodatkowo w oligodendrocytach odnotowaliśmy zmiany ilościowe 86 różnych miRNA, w tym miR-20a, odpowiedzialnego za regulację syntezy białka PLP/DL20, podstawowego budulca osłonki mielinowej. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują na to, że obserwowany klinicznie zaburzony proces rekonwalescencji pacjentów z stwardnieniem rozsianym prawdopodobnie dotyczy zaburzeń w dojrzewaniu prekursorów oligodendrocytów w kierunku komórek produkujących białka mieliny (MBP, MOG, PLP/DL20). Swoiste limfocyty naciekające mózg również charakteryzują się ze zmianami profilu miRNA, kontrolowanego poprzez ekspresję białek Ago1-5 i GW182.

1. Lewkowicz P, Cwiklińska H, Mycko MP, Cichalewska M, Domowicz M, **Lewkowicz N**, Jurewicz A and Selmaj KW. Dysregulated RNA-induced silencing complex (RISC) assembly within CNS corresponds with abnormal miRNA expression during autoimmune demyelination. J Neurosci. 2015; 35: 7521–7537.

IF 6,747; MNiSW 40

#### **VII. Sumaryczny impact factor według listy Journal Citation Report zgodnie z rokiem opublikowania**

- 32,933 punktów

#### **VIII. Liczba cytowani publikacji (listopad 2015)**

- według bazy Web of Science Core Collection: 200

#### **IX. Indeks Hirscha (listopad 2015)**

- według bazy Web of Science Core Collection: 6

#### **X. Kierowanie międzynarodowymi i krajowymi projektami badawczymi oraz udział w takich projektach**

1. KBN 2 P05E 091 26 - „Udział mechanizmów autoimmunizacyjnych w patogenezie aft nawracających”, 2003-2006 - kierownik projektu
2. KBN 3 P05A 067 25 „Rola limfocytów T CD4+ oraz CD8+ w modyfikacji funkcji ludzkich neutrofilii”, 2003-2006 – główny wykonawca
3. KBN N401 1569 333 „Badania nad mechanizmami indukcji apoptozy ludzkich neutrofilii przez limfocyty T regulatorowe CD4+CD25+ - udział dróg przekazywania komórkowego CTLA4-IDO, IL10-SOCS3, Fas-FasL oraz perforyn i granzymów”, 2007-2010 – główny wykonawca



4. KBN N N402 4445 33 „Udział mechanizmów autoimmunizacyjnych w patogenezie aft nawracających - rola limfocytów T efektorowych CD4+ i CD8+ oraz regulatorowych CD4+CD25+”, 2007-2011 – główny wykonawca
5. OPUS: 2014/13/B/NZ6/00235 „Zaburzenie funkcji cząsteczek mikroRNA odpowiadających za dojrzewanie prekursorów oligodendrocytów jako przyczyna upośledzonej remielinizacji w stwardnieniu rozsianym” – wykonawca, w trakcie realizacji
6. OPUS: 2015/17/B/NZ6/04251 „Poszukiwanie genów związanych z białkiem histonowym H3K4me3 odpowiedzialnych za polaryzację neutrofilek w kierunku komórek supresorowych w stanach zapalnych trudno poddających się leczeniu” – wykonawca, w trakcie realizacji

## **XI. Międzynarodowe i krajowe nagrody za działalność naukową**

1. Nagroda redakcji czasopisma Dental and Medical Problems i wydawnictwa Kwintesencja za najlepszą pracę oryginalną opublikowaną w 2002 roku, (Wrocław 2003)
2. Nagroda Polskiego Towarzystwa Immunologii Klinicznej i Doświadczalnej za najlepszą prezentację 13 zjazdu Towarzystwa (Kraków 2008)

## **XII. Wygłoszenie referatów i udział w międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych i tematycznych**

1. **Gurańska N**, Urbaniak B, Lewkowicz P, Tchórzewski H: The assessment of ROI production by peripheral blood polymorphonuclear leukocytes in patients with recurrent aphthous stomatitis. 14<sup>th</sup> European Meeting EFIS, Poznań 2000, Immunol. Lett. 2000, 73, 23, 218.
2. **Gurańska N**, Lewkowicz P, Urbaniak B, Banasik M, Głowacka E, Peterson R, Tchórzewski H: Ocena ekspresji cząsteczek adhezyjnych oraz produkcji reaktywnych form tlenu przez neutrofile krwi obwodowej u pacjentów z aftami nawrotowymi. IX Zjazd Polskiego Towarzystwa Immunologii Doświadczalnej i Klinicznej, Poznań 2000, Integryna 2000, 41,
3. **Gurańska N**, Lewkowicz P, Banasik M, Urbaniak B, Tchórzewski H: Peripheral blood neutrophils are primed in recurrent aphthous stomatitis. 11<sup>th</sup> International Congress of Immunology, Stockholm 2001, Scand. J. Immunol. 2001, 54 suppl, 842.

4. **Lewkowicz N**, Kurnatowska A, Lewkowicz P, Banasik M, Tchórzewski H.: Rola odporności nieswoistej w patogenezie aft nawrotowych. Konferencja naukowa Sekcji Periodontologii PTS Parodontologia Quo Vadis? Szklarska Poręba 2002.
  5. **Lewkowicz N.**: Nowe spojrzenie na etiopatogenezę i leczenie aft nawracających. Zebranie dolnośląskiego oddziału PTS, Wrocław 2003.
  6. **Lewkowicz N**, Banasik M, Kurnatowska A, Tchórzewski H, Lewkowicz P: Zaburzenia równowagi produkcji cytokin typu Th1 i Th2 u chorych z aftami nawracającymi. X kongres Stomatologów Polskich, Wrocław 2004, Czas. Stomat. 2004, LVII, 4 supl., 149.
  7. **Lewkowicz N**, Tchórzewski H, Kurnatowska A, Lewkowicz P.: Obecność autoprzeciwciał przeciw desmosomom u chorych z aftami nawracającymi. Konferencja Naukowa Sekcji Periodontologii PTS Jama Ustna Jako Logo Chorób Układowych, Wrocław 2004.
  8. **Lewkowicz N**, Banasik M, Tchórzewski H, Kurnatowska A, Lewkowicz P.: Przewaga wytwarzania cytokin typu Th1 u chorych z aftami nawracającymi. Konferencja Naukowa Sekcji Periodontologii PTS Jama Ustna Jako Logo Chorób Układowych, Wrocław 2004.
  9. **Lewkowicz N**, Lewkowicz P, Kurnatowska A, Tchórzewski H: Dysfunkcja limfocytów regulatorowych T CD4+CD25+ u chorych z aftami nawracającymi. Międzynarodowa Konferencja Naukowa Sekcji Periodontologii PTS „Nowe technologie w służbie periodontologii”, Białowieża 2006.
  10. **Lewkowicz N**. Recurrent aphthous stomatitis – aspects of pathogenesis and treatment. Nordic-Baltic Oral Medicine Meeting, Malmo, Szwecja 2007.
  11. **Lewkowicz N**, Lewkowicz P, Dzitko K, Kur B, Tarkowski M, Kurnatowska A, Tchórzewski H: Dysfunction of CD4+CD25high T regulatory cells in patients with recurrent aphthous stomatitis. XIII Congress of Polish Society of Experimental and Clinical Immunology, Kraków 2008, Cent. Eur. J. Immunol. 2008, 33 suppl, 70.
  12. **Lewkowicz N**, Lewkowicz P, Kur B, Tarkowski M, Kurnatowska A, Tchórzewski H: Ekspresja genów typu Th1/Th2/Th3/Th17 w aftach nawracających. Międzynarodowa Konferencja Naukowa Sekcji Periodontologii PTS „Środowisko a stan jamy ustnej. Postępy w diagnostyce i leczeniu chorób przyzębia i błony śluzowej jamy ustnej”, Białystok 2008.
- Lewkowicz N**, Lewkowicz P. Detection of IL-10-producing neutrophils in chronic periodontitis. EuroPerio 8, London 2015. J Clin Periodontol 2015, 42, S17: 79.

### **XIII. Dorobek dydaktyczny i popularyzatorski oraz informacja o współpracy międzynarodowej habilitanta**

#### **1. Osiągnięcia dydaktyczne i w zakresie popularyzacji nauki**

- Adiunkt dydaktyczny w zakresie przedmiotu Periodontologia dla studiów w języku angielskim, Zakład Periodontologii i Chorób Błony Śluzowej Jamy Ustnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, 2014-2015, Zakład Stomatologii Ogólnej od 2015
- Prowadzenie zajęć dydaktycznych z zakresu periodontologii i chorób błony śluzowej jamy ustnej w języku polskim i angielskim, Zakład Periodontologii i Chorób Błony Śluzowej Jamy Ustnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, 2003-2015, Zakład Stomatologii Ogólnej od 2015
- Przygotowanie i przeprowadzanie dyplomowych egzaminów praktycznych i teoretycznych dla studentów V roku z zakresu periodontologii i chorób błony śluzowej jamy ustnej. Zakład Periodontologii i Chorób Błony Śluzowej Jamy Ustnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, 2014-2015, Zakład Stomatologii Ogólnej od 2015
- Przygotowanie sylabusów przedmiotu periodontologia i choroby błony śluzowej jamy ustnej w języku angielskim. Zakład Periodontologii i Chorób Błony Śluzowej Jamy Ustnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, 2003-2015, Zakład Stomatologii Ogólnej od 2015
- Przygotowanie i prowadzenie kursu specjalizacyjnego pt. „Choroby błony śluzowej jamy ustnej”, Zakład Periodontologii i Chorób Błony Śluzowej Jamy Ustnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, 2007
- Przygotowanie i wygłoszenie wykładu pt. „Wpływ chorób przyzębia na organizm” w trakcie festiwalu Zdrowia w Tuszynie, 2014
- Przygotowanie i wygłoszenie wykładu pt. „Podstawowe zabiegi profilaktyczne w leczeniu periodontopatii”, II Ogólnopolska Konferencja Higienistek i Asystentek Stomatologicznych, Łódź 2015
- Przygotowanie i wygłoszenie wykładu pt. „Choroby przyzębia – diagnostyka, profilaktyka, leczenie”, 25th Central European Dental Exhibition, Poznań 2015

## **2. Opieka naukowa nad studentami, lekarzami w toku specjalizacji i doktorantami**

- Opiekun studenckiego koła naukowego przy Zakładzie Periodontologii i Chorób Błony Śluzowej Jamy Ustnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, 2004-2005
- Kierownik specjalizacji w dziedzinie periodontologii, Poradnia Periodontologii i Chorób Błony Śluzowej Jamy Ustnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi –1 osoba ukończona specjalizacji, 2 osoby w trakcie specjalizacji
- Małgorzata Kulińska-Michalska, w trakcie studiów doktoranckich, Zakład Stomatologii Ogólnej, od 2015, opiekun naukowy

## **3. Staże w zagranicznych i krajowych ośrodkach naukowych lub akademickich**

- Zakład Immunologii Klinicznej, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi, 2000, 2004
- Pracownia Neuroimmunologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, 2014

## **4. Recenzowanie projektów międzynarodowych i krajowych**

- Recenzowanie projektów badawczych dla Narodowego Centrum Nauki, 2 projekty, 2011

## **5. Recenzowanie publikacji w czasopismach międzynarodowych i krajowych**

- Oral Diseases, 2007-2008, 2 manuskrypty
- European Journal of Oral Science, 2008, 1 manuskrypt

## **6. Członkostwo w międzynarodowych i krajowych organizacjach oraz towarzystwach naukowych**

- Polskie Towarzystwo Stomatologiczne, 2001-2010, członek

- Polskie Towarzystwo Stomatologiczne, 2006-2008, członek zarządu łódzkiego oddziału Polskiego Towarzystwa Stomatologicznego
- Polskie Towarzystwo Periodontologiczne, od 2014, członek
- European Federation of Periodontology, od 2014, członek

## 7. Inne osiągnięcia

- Konsultant Wojewódzki w dziedzinie Periodontologii, od 2014

*Natalia Jankowska*