Szczecin 07.04.2016

Ocena osiągnięć naukowych i aktywności naukowej

dr n. med. Natalii Lewkowicz przygotowana w postępowaniu habilitacyjnym

1. Życiorys naukowo-dydaktyczny Habilitantki

Dr n. med. Natalia Lewkowicz jest zatrudniona na stanowisku adiunkta w Zakładzie Stomatologii Ogólnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Habilitantka w 1999 roku ukończyła z wyróżnieniem studia w Akademii Medycznej w Łodzi na Wydziale lekarskim, od 1999-2000 roku odbywała staż podyplomowy w Instytucie Stomatologii Akademii Medycznej w Łodzi. W 2001zatrudniona została w Poradnia Periodontologii i Chorób Błony Śluzowej Jamy Ustnej Centralnego Szpitala Klinicznego w Instytucie Stomatologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. W latach 2003-2007 pracowała w Zakładzie Periodontologii i Chorób Błony Śluzowej Jamy Ustnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi na stanowisku asystenta a od 2008 do 2015 roku na stanowisku adiunkta.

Doktor Natalia Lewkowicz z wyróżnieniem w 2002 roku uzyskała stopień doktora nauk medycznych na podstawie rozprawy doktorskiej, nt.: "Badania nad udziałem neutrofilów krwi obwodowej w patogenezie aft nawrotowych". W 2005 roku otrzymała tytuł specjalisty w dziedzinie stomatologii ogólnej a w 2009 roku tytuł specjalisty w dziedzinie periodontologii.

2. Ocena dorobku naukowego

W dorobku naukowo-badawczym zgromadziła publikacje naukowe w czasopismach (bez suplementów) oceniane łączną punktacją Impact Factor **32,933**, Punktacja MNiSW **272,5** i Index Copernicus **92,45**. Jako pierwszy autor uzyskała Impact Factor **17,995**, punktację MNiSW **144** punktów i Index Copernicus **61,82**

Tytuł osiągnięcia naukowego, 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.) brzmi:

„Regulacja neutrofili i limfocytów T efektorowych przez limfocyty regulatorowe T $CD4^{+}CD25^{+}$ u osób zdrowych i w wybranych patologiach błony śluzowej jamy ustnej i przyzębia"

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

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

3. Ocena cyklu prac włączonych do postępowania habilitacyjnego

Cykl prac składający się na szczególne osiągnięcia naukowe dr n. med. Natalii Lewkowicz poświęcony jest zaburzeniom regulacji funkcji neutrofili, komórek nieswoistej odpowiedzi immunologicznej, oraz efektorowych limfocytów T, które stanowią istotną przyczynę powikłań przewlekłych stanów zapalnych.

W badaniach Habilitantka oceniała funkcję limfocytów T regulatorowych $CD4^{+}CD25^{high}FOXP3^{+}$ w warunkach *in vitro* w interakcjach z autologicznymi neutrofilami lub efektorowymi limfocytami $CD4^{+}CD25^{-}$ u osób zdrowych. Odkrycia dokonane w

badaniach *in vitro* na komórkach pochodzących od zdrowych dawców potwierdziła 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 neutrofili. Doktor Natalia Lewkowicz wykazała, że hamują one wszystkie efektorowe funkcje neutrofili i indukują ich apoptozę. Neutrofile po kontakcie z limfocytami Treg nabywają cech komórek supresorowych. Na podstawie wyników badań zaproponowała istotne rozszerzenie teorii *infectious tolerance*. Wykazała, 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 neutrofili w komórki wytwarzające IL-10 i ich apoptozę. Wcześniejsza ekspozycja neutrofili na LPS całkowicie blokuje możliwość ich polaryzacji w kierunku komórek supresorowych. Poznanie genów biorących czynny udział w deaktywacji neutrofili, stwarza nowe możliwości terapeutyczne w leczeniu pacjentów z zakażeniami wywołanymi bakteriami Gram-ujemnymi.

W publikacji pierwszej: Lewkowicz P, **Lewkowicz N**, Sasiak A, Tchórzewski H. Lipopolysaccharide-activated $CD4^{+}CD25^{+}$ T regulatory cells inhibit neutrophil function and promote their apoptosis and death.

Pierwszym osiągnięciem było wykazanie, że limfocyty Treg hamują wszystkie efektorowe funkcje neutrofili, które po interakcji bezpośredniej komórka-komórka z limfocytami Treg stawały się komórkami apoptotycznymi. Wykazano, że ewolucyjnie młodsze (limfocyty Treg) mogą kontrolować funkcje komórek ewolucyjnie starszych oraz, 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 transkrypcyjnego FOXP3 ulega translokacji z cytozolu do jądra komórki podczas ekspozycji limfocytów Treg na LPS. Odkrycie tę wskazuje, 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.

Za odkrycie supresorowego działania limfocytów Treg w stosunku do neutrofili oraz wykazania bezpośredniego wpływu LPS na limfocyty Treg, Habilitantka otrzymała wraz

współautorami publikacji nagrodę Polskiego Towarzystwa Immunologii Klinicznej i Doświadczalnej na Zjeździe Towarzystwa w 2008 roku.

Publikacja druga: **Lewkowicz N**, Lewkowicz P, Dzitko K, Kur B, Tarkowski M, Kurnatowska A, Tchórzewski H.: Dysfunction of $CD4^{+}CD25^{high}$ T regulatory cells in patients with recurrent aphthous stomatitis.

Praca prezentuje badania nad regulacją limfocytów T efektorowych przez limfocyty Treg u chorych z aftami nawracającymi.

Z badań Habilitantki wynika, że u pacjentów z aftami nawracającymi występuje aktywacja obwodowych neutrofili i zaburzenie równowagi w wytwarzaniu cytokin pro- i przeciwzapalnych przez komórki jednojądrzaste i zmniejszenie odsetka obwodowych limfocytów Treg. W badaniach wykazano również mniejszą ekspresję IDO, która może być odpowiedzialna m.in. za zaburzenie powstawania obwodowych specyficznych antygenowo limfocytów Treg, co może być przyczyną nadreaktywności limfocytów Th1 i Th2 u chorych z aftami nawracającymi. Podsumowując, nadreaktywne populacje limfocytów T efektorowych mogą być mniej wrażliwe na działanie supresorowe limfocytów Treg, co konsekwencji może doprowadzić do reakcji zapalnej, niszczenia keratynocytów jamy ustnej i powstawania aft.

Uzyskane wyniki na temat patogenezy stanów zapalnych podkreślają nadrzędną rolę limfocytów Treg i zmieniają spojrzenie w zagadnieniach ich regulacji.

Publikacja trzecia: **Lewkowicz N**, Klink M, Mycko MP, Lewkowicz P. Neutrophil-$CD4^{+}CD25^{+}$ T regulatory cell interactions: a possible new mechanism of infectious tolerance.

Odkrycie supresyjnego działania limfocytów Treg w stosunku do neutrofili, a także możliwości aktywacji limfocytów Treg przez TLR4 jest bardzo doniosłym odkryciem w perspektywie nie tylko zrozumienia mechanizmów regulacyjnych ale ma doniosłe znaczenie w aspekcie klinicznym.

Wykazano bowiem, że 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.

Habilitantka w swoich badaniach udowodniła, że zarówno limfocyty Treg uprzednio aktywowane LPS, jak i mAb anty-CD3/CD28 zwiększają w neutrofilach zdolność do syntezy TGF-β1. Wykazała również, 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.

Opisane wyniki pozwoliły sformułować własną hipotezę regulacji zapalania i zaproponować rozszerzenie teorii '*infectious tolerance*'.

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

W kolejnej publikacji doprecyzowano zarys teorii regulacji zapalenia z udziałem aktywowanych limfocytów Treg i neutrofili i potwierdzono mechanizm działania limfocytów Treg stymulowanych LPS w stosunku do neutrofili.

Poddano weryfikacji hipotezę o parakrynnym działaniu IL-10 produkowanej przez neutrofile, która indukuje wytwarzanie IL-10 przez kolejne neutrofile, wyjaśniono kwestię apoptozy neutrofili. Odsetek komórek apoptotycznych korelował z podobnym odsetkiem neutrofili produkujących IL-10, co wskazywało że oba te procesy występują jednoczasowo.

Kluczowym elementem w indukcji supresorowych neutrofili okazała się metylacja białka histonowego H3 w regionie K4 i odkrycie, że wcześniejsza ekspozycja neutrofili na LPS całkowicie blokuje możliwość metylacji białka histonowego H3 w regionie K4 i tym samym polaryzacji neutrofili 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. Badanie potwierdziło, że u osób z przewlekłym zapaleniem przyzębia większość neutrofili obecnych w wysięku zapalnym wytwarzało IL-10, podczas gdy u pacjentów z aseptycznym zapaleniem żaden z obecnych w polu widzenia neutrofili 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 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 dezaktywacji neutrofili może stanowić istotną przyczynę powikłań.

Wartość naukowa i kliniczna przedstawionych prac i ich wyniki mogą być w przyszłości wykorzystane do opracowania skutecznego sposobu na odblokowanie lub wymuszoną aktywację genów związanych z polaryzacją neutrofili w kierunku komórek supresorowych. Wskazanie potencjalnych celów terapii może mieć praktyczne znaczenie w projektowaniu, wysoce swoistej terapii genowej.

VI. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

1. Immunologiczne aspekty patogenezy aft nawracających jamy ustnej

Zasadniczym kierunkiem zainteresowań naukowych i lekarskich Habilitantki są problemy patogenezy i leczenia chorób błony śluzowej jamy ustnej, a w szczególności aft nawracających jamy ustnej. Temu zagadnieniu poświęcono 9 prac, w których wykazano, że u podłoża aft nawracających leży nadreaktywność układu immunologicznego, zarówno odporności wrodzonej, jak i nabytej. Cechy aktywacji neutrofili krwi obwodowej i układu dopełniacza były stwierdzone nie tylko w fazie aktywnej choroby, lecz również w fazie remisji.

W kolejnych badania nad patogenezą aft nawracających badań wykazano, 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 chorych z RAU

wytwarzają zwiększone ilości cytokin typu Th1: IFN-γ, IL-2, TNF, a zmniejszoną ilość cytokin o działaniu supresyjnym IL-10 i TGF-β. Podobny profil wytwarzanych cytokin był wykazany zarówno w fazie aktywnej, jak i w fazie bezobjawowej choroby.

Doktor Lewkowicz przeprowadziła również badania nad ekspresją genów w błonie śluzowej jamy ustnej chorych z aftami nawracającymi i wykazała 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 odpowiedź typu Th2, Th3 czy Th17 nie ulegają ekspresji.

W przeprowadzonych badaniach nad patogenezą aft nawracających Habilitantka wykazała, że wiele elementów odpowiedzi immunologicznej u chorych z RAU charakteryzuje zwiększona reaktywność, nie wykazała 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**.

Wniosek końcowy

Po wnikliwej ocenie dostępnych materiałów dokumentujących osiągnięcia naukowego w postaci cyklu publikacji nt.: " **Regulacja neutrofili i limfocytów T efektorowych przez limfocyty regulatorowe T $CD4^+CD25^+$ u osób zdrowych i w wybranych patologiach błony śluzowej jamy ustnej i przyzębia"** i pozostałej aktywności naukowej dr n. med. Natalii Lewkowicz, stwierdzam, że Kandydatka spełnia wszystkie formalne i zwyczajowe wymogi niezbędne do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego w dziedzinie nauk medycznych w dyscyplinie stomatologia. Bogaty dorobek naukowy w piśmiennictwie międzynarodowym dowodzi umiejętności samodzielnej pracy naukowej i wnoszenie nowatorskich rozwiązań klinicznych w dziedzinie stomatologii. Kandydatka wykazuje umiejętność pracy zespołowej, co we współczesnej medycynie jest niezbędnym warunkiem prowadzenia badań interdyscyplinarnych.

Dlatego przedstawiam Wysokiej Radzie Wydziału Lekarsko Uniwersytetu Medycznego w Łodzi wniosek o dopuszczenie dr n. med. Natalii Lewkowicz do dalszych etapów

postępowania habilitacyjnego z pełnym uznaniem Jej dorobku naukowego, osiągnięć dydaktycznych i organizacyjnych..

Elżbieta Dembowska

Dr hab. n. med. Elżbieta Dembowska

Szczecin 07.04.2016r.