

dr hab. Magdalena Żurawek
Zakład Patologii Molekularnej
Instytut Genetyki Człowieka PAN

Poznań, 26 maja 2025 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

Pani mgr Urszuli Ławrynowicz

**pt. „Udział osi CCR5-CCL5 w zależnej od limfocytów Treg regulacji odpowiedzi zapalnej
u pacjentów z cukrzycą typu 1”**

Na podstawie uchwały Rady Nauk Medycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, powierzającej mi rolę recenzenta, zamieszczam ocenę dysertacji Pani mgr Urszuli Ławrynowicz przedstawionej w przewodzie doktorskim.

Praca doktorska mgr Urszuli Ławrynowicz, wykonana w Katedrze i Zakładzie Immunologii Medycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, pod kierunkiem dr hab. Moniki Ryby-Stanisławowskiej, porusza istotny temat w dziedzinie immunologii i diabetologii – rolę osi chemokiny CCL5 i jej receptora oraz funkcji limfocytów regulatorowych w kontekście patogenezy i przebiegu cukrzycy typu 1.

Celem badań była ocena wpływu modulacji osi CCR5-CCL5 na zdolność limfocytów regulatorowych do migracji, wydzielania przeciwzapalnej interleukiny 10 (IL10) oraz funkcje immunosupresyjne. Doktorantka przeprowadziła analizy asocjacyjne polimorfizmu CCR5-Δ32 z obrazem klinicznym pacjentów z cukrzycą typu 1. Ponadto, oceniła zależność pomiędzy cechami fenotypowymi i funkcjonalnymi limfocytów regulatorowych a parametrami klinicznymi pacjentów z cukrzycą typu 1. Uzyskane wyniki dostarczyły ważnych informacji dotyczących roli osi CCR5-CCL5 w mechanizmach immunologicznych i metabolicznych towarzyszących cukrzycy typu 1, wskazując potencjalne kierunki interwencji terapeutycznych.

Przestawiona do recenzji praca została przygotowana w języku polskim i posiada strukturę typową dla dysertacji doktorskiej. Rozpoczyna się od szczegółowego i przejrzystego spisu treści, wykazu skrótów, streszczenia w języku polskim i angielskim, wprowadzenia oraz celu pracy. Kolejna część obejmuje charakterystykę grupy badanej, opis zastosowanych metod badawczych i analiz statystycznych, omówienie wyników, dyskusję, wnioski, piśmiennictwo, wykaz rycin i tabel. Dalej następują załączniki obejmujące listę wykorzystanych odczynników oraz publikację oryginalną, opisującą część ujętych w rozprawie wyników. Praca, w której Pani mgr Urszula Ławrynowicz jest pierwszym autorem została opublikowana w *Immunologic Research*, czasopiśmie o międzynarodowym zasięgu, uznawanym za rzetelne źródło wiedzy w dziedzinie immunologii. Dysertacja doktorska obejmuje 88 stron, 12 rycin i 8 tabel, a zamykają 133 pozycje piśmiennictwa (w zdecydowanej większości datowanego po 2010 r.). Struktura rozprawy jest logicznie uporządkowana i pozwala czytelnikowi zapoznać się z opisanym problemem badawczym.

W rozdziale **Wprowadzenie**, obejmującym 21 stron, Pani mgr Urszula Ławrynowicz zaprezentowała ogólną wiedzę teoretyczną w tematyce prowadzonych badań. Doktorantka rozpoczyna od omówienia podstawowych informacji dotyczących etiologii i patogenezы cukrzycy typu 1. W podrozdziale dotyczącym uwarunkowań genetycznych cukrzycy typu 1 wskazano haplotypy układu HLA i warianty polimorficzne regionu promotorowego insuliny, jako czynniki ryzyka. Natomiast pozostałe geny : *CTLA4*, *IL2RA* i *PTPN22*, zostały ujęte w sposób bardzo ogólny, bez wskazania kluczowych polimorfizmów będących czynnikiem ryzyka rozwoju tej autoimmunologicznej choroby. Następnie Pani mgr Urszula Ławrynowicz przeprowadza charakterystykę limfocytów T regulatorowych (Treg), nakreślając ich udział w patogenezie cukrzycy typu 1. Elementem wieńczącym Wprowadzenie jest szczegółowy opis osi CCR5-CCL5, obejmujący charakterystykę strukturalną i funkcjonalną, znaczenie w rozwoju cukrzycy typu 1 oraz udział osi CCR5-CCL5 w modulacji funkcji limfocytów T regulatorowych. Doktorantka odnosi się do wyników badań wstępnych, przeprowadzonych w zespole, które wskazały protekcyjny charakter wariantu CCR5-Δ32 w rozwoju cukrzycy typu 1. Uzyskane wyniki stanowiły podstawę do przeprowadzenia funkcjonalnych analiz osi CCR5-CCL5. Podsumowując, lektura tego rozdziału jest doskonałym wprowadzeniem do tematyki pracy. Pani mgr Urszula Ławrynowicz przedstawiła w nim aktualny stan wiedzy na temat roli osi CCR5-CCL5 w patogenezie cukrzycy typu 1 oraz wskazała potrzebę realizacji dalszych badań w celu lepszego poznania tego szlaku chemokinowego w procesie autoimmunizacji.

W rozdziale **Cel Pracy**, Doktoranta w sposób ogólny formułuje cel główny badania. Podaje, iż celem pracy jest ocena wpływu osi sygnałowej CCR5-CCL5 na regulację odpowiedzi zapalnej zależnej od limfocytów T regulatorowych. Jest to pewne nadużycie, ponieważ przedmiotem badania nie była identyfikacja mechanizmów przyczynowo- skutkowych, a raczej wskazanie zależności pomiędzy osią CCR5-CCL5 a procesem zapalnym zależnym od limfocytów T regulatorowych. Następnie Pani mgr Urszula Ławrynowicz wskazuje trzy cele szczegółowe, które również wymagają doprecyzowania, aby jednoznacznie określić zakres realizowanych badań. Czytamy „*Określenie, w jaki sposób polimorfizm CCR5-Δ32 może wpływać na charakterystykę kliniczną oraz zmiany homeostazy układu odpornościowego, w szczególności limfocytów T regulatorowych (Treg) u dzieci z cukrzycą typu 1*”. Badanie nie obejmowało oceny funkcjonalnej polimorfizmu CCR5-Δ32 i jego wpływu na parametry kliniczne, a dotyczyło analizy korelacji genotyp-fenotyp, co powinno być jasno wskazane. Reasumując, cele rozprawy doktorskiej zostały zarysowane, jednak ich doprecyzowanie i bardziej jednoznaczne sformułowanie mogłyby przyczynić się do przejrzystości tej dysertacji doktorskiej.

Rozdział **Materiały i Metody** przedstawia najpierw schemat podziału grupy badanej i kontrolnej. Przyporządkowuje grupy określonym celom szczegółowym pracy i wykonanym analizom. Schemat jest przejrzysty, istotnie ułatwia orientację w strukturze dysertacji oraz analizę omówionych w dalszej części wyników. Grupa badana obejmowała pacjentów pediatrycznych z cukrzycą typu 1, u których wykluczono inne choroby autoimmunologiczne, ostre schorzenia zapalne, zakaźne i powikłania mikronaczyniowe. Grupę kontrolną stanowili zdrowi dawcy, dobrani pod względem wieku i płci, bez klinicznych objawów schorzeń autoimmunologicznych i obciążonego wywiadu rodzinnego. Grupy zostały podzielone na dwie podgrupy, z czego jedna liczyła 380 pacjentów z cukrzycą typu 1 i 150 zdrowych ochotników, a druga obejmowała 42 pacjentów z długotrwałą cukrzycą typu 1 i 21 zdrowych dawców. Imponująca liczebność grupy pacjentów stanowi istotny atut badania. Analizy przeprowadzone w tak licznej grupie cechuje wysoka moc statystyczna, co zwiększa wiarygodność uzyskanych wyników. Dalsza część rozdziału zawiera opis parametrów klinicznych, stanowiących podstawę rekrutacji do badania. Materiał do analiz pobierany był podczas hospitalizacji na oddziale Kliniki Pediatrii, Diabetologii i Nefrologii Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego, po wcześniejszym przygotowaniu pacjentów do badań, w wystandaryzowanych warunkach, co pozwoliło zminimalizować wpływ czynników zewnętrznych.

W następnej części rozdziału, Doktorantka wyczerpująco opisuje zastosowane **Metody**. Analiza polimorfizmu CCR5-Δ32 została przeprowadzona w oparciu o ocenę długości amplifikowanych fragmentów DNA w 2% żelu agarozowym. Zastosowana metoda pozwala jednoznacznie określić warianty dzikie i zmutowane, różniące się długością 32 nukleotydów. Ocena stężenia wybranych chemokin w osoczu krwi oraz interleukiny 10 w supernatantach komórkowych została przeprowadzona z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych testów ELISA, charakteryzujących się wysoką czułością i specyficznością. W kolejnej części rozdziału, Pani mgr Urszula Ławrynowicz szczegółowo opisuje metody zastosowane dla oceny limfocytów T regulatorowych u pacjentów z cukrzycą typu 1. Subpopulacja limfocytów CD4+CD25+CD127low została wyizolowana z całkowitej populacji komórek jednojądrzastych krwi w oparciu o metodę separacji magnetycznej, która jest powszechnie stosowaną i efektywną procedurą ich izolacji. Czystość uzyskanych populacji była wysoka. Wynosiła od 86% do 96%, co potwierdziła analiza cytometryczna, oparta o właściwą strategię bramkowania. W celu określenia aktywności immunosupresyjnej limfocytów T regulatorowych, przeprowadzono test supresji interferonu γ (IFN- γ). Dla oceny wskaźnika chemotaktycznego limfocytów T regulatorowych w odpowiedzi na stymulację ligandem CCL5, przeprowadzono test migracji. W przypadku opisanej metody, nasuwa się pytanie natury metodycznej, czy zastosowanie filtrów membranowych o wielkości porów 5,0 μm , pozwala zaobserwować migrację aktywowanych komórek regulatorowych o średnicy od 10 μm – 15 μm ? Uzyskane dane poddano analizie uznanymi i adekwatnymi testami statystycznymi.

Wyniki przedstawiono w odrębnym rozdziale w formie opisowej, na rycinach i w tabelach. Pierwszą część opisu poświęcono charakterystyce pacjentów z cukrzycą typu 1, stratyfikowanych pod względem genotypu CCR5-Δ32. Doktorantka przeprowadziła wnikliwą analizę grupy chorych z T1D uwzględniającą wiek, czas trwania choroby, wskaźnik BMI, hemoglobinę glikowaną, glukozę na czczo, ciśnienie krwi oraz wskaźnik filtracji kłębuszkowej eGFR. Pani mgr Urszula Ławrynowicz wykazała, iż nosiciele allelu Δ32, charakteryzowali się wyższymi wartościami hemoglobiny glikowanej HbA1 oraz wyższym stężeniem glukozy na czczo w porównaniu z dawcami o prawidłowym genotypie, co wskazuje na gorszą kontrolę glikemii. Dla zwiększenia mocy testu statystycznego, Doktorantka zastosowała właściwe podejście metodyczne, łącząc grupę heterozygot i homozygot tego wariantu. Następnie dokonano analizy rozkładu genotypu CCR5-Δ32 u pacjentów z zaburzeniami metabolicznymi, manifestowanymi dyslipidemią oraz grupą chorych bez zaburzeń gospodarki lipidowej.

Wykazano znamioną statystycznie asocjację wariantu $\Delta 32$ z nieprawidłowym profilem lipidowym u pacjentów z cukrzycą typu 1, co może być potencjalnym markerem genetycznym zwiększonego ryzyka nieprawidłowości lipidowych, a także czynnikiem prognostycznym powikłań makronaczyniowych w późniejszym okresie życia. W charakterystyce tych analiz asocjacyjnych wkraść się błąd edytorski. Tabela nr 5 nie przedstawia rozkładu genotypu CCR5- $\Delta 32$ i parametrów lipidowych (HDL, LDL, TG) u pacjentów z T1D, a częstość analizowanego polimorfizmu u pacjentów z prawidłowym i nieprawidłowym profilem lipidowym. W kolejnym etapie Pani mgr Urszula Ławrynowicz dokonała oceny zależności pomiędzy stężeniem ligandów receptora CCR5 a stadium rozwoju cukrzycy typu 1. Stężenia cytokin CCL5, CCL4, CCL3, CCL2 zostały zmierzone w grupie pacjentów z nowo zdiagnozowaną oraz długotrwałą cukrzycą typu 1. Na szczególną uwagę zasługują obserwacje zmian w stężeniach chemokiny CCL5. Poziom CCL5 był najniższy w grupie kontrolnej, wyższy w grupie z nowo zdiagnozowaną cukrzycą typu 1 i najwyższy w grupie z przewlekłą postacią choroby. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki sugerują potencjalny związek chemokiny CCL5 z przewlekłym stanem zapalnym, nasilającym się wraz z postępem choroby i są spójne z doniesieniami literaturowymi. Ponadto zaobserwowano podwyższone stężenie CCL5 u nosicieli wariantu $\Delta 32$ w porównaniu z chorymi o prawidłowym genotypie, co dodatkowo potwierdza trafność przyjętej hipotezy o udziale osi CCL5-CCR5 w procesie zapalnym w cukrzycy typu 1. W dalszej części rozdziału mgr Urszula Ławrynowicz dokonuje charakterystyki osi CCL5-CCR5 w kontekście limfocytów regulatorowych. Ocena ilościowa, przeprowadzona w oparciu o analizę cytometryczną, wykazała istotne obniżenie zarówno całkowitej populacji limfocytów T regulatorowych, jak i subpopulacji Treg wykazujących ekspresję CCR5 u pacjentów z cukrzycą typu 1 w porównaniu do grupy kontrolnej. Dodatkowo brak lub znaczne obniżenie ekspresji CCR5 związane były z istotnym spadkiem liczby limfocytów T regulatorowych. Doktorantka wskazała dodatnią korelację pomiędzy poziomem tego receptora powierzchniowego a ekspresją czynnika transkrypcyjnego FOXP3, który jest kluczowy dla funkcji immunosupresyjnych Treg. Jest to interesująca obserwacja, w kontekście antagonistycznego charakteru osi CCR5-CCL5 i FOXP3. W planach badawczych można pokusić się o analizy funkcjonalne, celem zweryfikowania tej zależności. W dalszej części rozdziału *Wyniki*, Pani mgr Urszula Ławrynowicz charakteryzuje wpływ stymulacji ligandem CCL5 na właściwości immunosupresyjne i chemotaktyczne limfocytów T regulatorowych oraz zdolność wytwarzania przez komórki przeciwzapalnej IL10. Doktorantka wskazuje, iż stymulacja 48h limfocytów Treg chemokiną CCL5 obniża liczbę

komórek efektorowych produkujących IFN- γ w grupie pacjentów z T1D. Czy uzyskane wyniki mają znamienność statystyczną, czy raczej pokazują pewien trend? W teście supresji IFN- γ zastosowano stężenie chemokiny CCL5 wynoszące 15 ng/ml. Na jakiej podstawie ustalono dawkę ligandu (dane eksperymentalne, literaturowe)? W kolejnym etapie Doktorantka wykazała istotne obniżenie wydzielania IL10 przez limfocyty T regulatorowe w warunkach stymulacji CCL5 w porównaniu do niestymulowanych komórek pochodzących od pacjentów z cukrzycą typu 1. Dodatkowo, w warunkach niestymulowanych, zdolność limfocytów regulatorowych do produkcji IL10 była niższa w grupie pacjentów z cukrzycą typu 1, w porównaniu do grupy kontrolnej, co potwierdza upośledzoną funkcję tych limfocytów w chorobach autoimmunizacyjnych. Uzyskane przez mgr Ławrynowicz wyniki sugerują negatywny wpływ chemokiny CCL5 na funkcje immunosupresyjne Treg w warunkach przewlekłego stanu zapalnego. Wykazano również obniżoną zdolność migracyjną limfocytów T regulatorowych stymulowanych CCL5 w grupie pacjentów z cukrzycą typu 1, jakkolwiek wyniki nie osiągnęły znamienności statystycznej. Zwiększenie liczby analizowanych próbek pozwoliłoby na dokładniejsze określenie wpływu cytokiny CCL5 na właściwości chemotaktyczne komórek Treg. Rozdział *Wyniki* podsumowuje ocenę zależności między cechami funkcjonalnymi i fenotypowymi limfocytów T regulatorowych a parametrami klinicznymi pacjentów z cukrzycą typu 1. Doktorantka, wykorzystując analizę składowych głównych oraz metodę hierarchicznego grupowania, wykazała, iż obniżona liczba limfocytów T regulatorowych CCR5+ jest czynnikiem ryzyka nadciśnienia tętniczego. Dodatkowo niższy odsetek Treg CCR5+ oraz związany z tym niekorzystny profil lipidowy, częściej występował u dziewczynek niż u chłopców. Uzyskane wyniki mogą mieć istotne implikacje kliniczne, jednak z uwagi na ograniczoną liczebność analizowanych grup, niezbędne są dalsze badania z udziałem większej populacji.

W *Dyskusji* dysertacji Pani mgr Urszula Ławrynowicz szczegółowo omawia uzyskane przez siebie wyniki zestawiając je z obserwacjami innych autorów oraz wynikami wcześniejszych badań własnych. Polimorfizm CCR5- Δ 32 dyskutowany jest w kontekście zaburzeń metabolicznych, głównie homeostazy lipidowej. Doktorantka wykazała silny związek pomiędzy tym wariantem polimorficznym a stanem zapalnym i zwiększonym ryzykiem powikłań sercowo-naczyniowych u pacjentów z przewlekłą cukrzycą typu 1. Wariant - Δ 32 jest szeroko opisywany w kontekście badań asocjacyjnych. Czy znane są dane literaturowe dotyczące funkcjonalnej oceny delecji genu *CCR5* w modelu *in vitro*? Pani mgr Urszula

Ławrynówicz poddaje wnikliwej dyskusji udział chemokin, w szczególności CCL5 oraz osi CCR5-CCL5 w patogenezie cukrzycy typu 1. Podkreśla złożoność sieci sygnalizacji immunologicznej, której elementem są chemokiny. Zatem wszelkie badania, wyjaśniające rolę cytokin chemotaktycznych, mają kluczowe znaczenie dla zrozumienia mechanizmów autoagresji, wskazania nowych biomarkerów, opracowania strategii prewencyjnych oraz określenia nowatorskich kierunków terapeutycznych. Analiza osi CCR5-CCL5, w kontekście właściwości immunosupresyjnych i chemotaktycznych limfocytów T regulatorowych, przyniosła interesujące obserwacje, które mogą rozwinąć obszar badawczy dotyczący modulacji odpowiedzi immunologicznej w chorobach autoimmunologicznych.

Wnioski są prawidłowo wyprowadzone z wyników uzyskanych w przedstawionej pracy. W jasny i syntetyczny sposób odpowiadają na postawione zadania badawcze. Ponadto wskazują znaczenie kliniczne uzyskanych wyników, co dodatkowo podnosi wartość przeprowadzonych badań.

Podsumowując, złożona rozprawa doktorska Pani mgr Urszuli Ławrynówicz pt. *„Udział osi CCR5-CCL5 w zależnej od limfocytów Treg regulacji odpowiedzi zapalnej u pacjentów z cukrzycą typu 1”* w pełni zasługuje na pozytywną ocenę, ze względu na wybór tematu, przeprowadzenie wielopłaszczyznowej analizy materiału badawczego, jasnego przedstawienia wyników oraz dojrzałej dyskusji uzyskanych wyników w kontekście dostępnych danych literaturowych. Przedstawiona dysertacja dostarcza ważnych informacji na temat mechanizmów immunologicznych i metabolicznych towarzyszących cukrzycy typu 1, wskazując na kluczowe zależności i potencjalne kierunki interwencji terapeutycznych.

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. z 2023 r. poz. 742) i wnoszę o dopuszczenie Pani mgr Urszuli Ławrynówicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wniosuję do Rady Nauk Medycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o przyznanie wyróżnienia.

Z poważaniem

Magdalena Żurawek

dr hab. Magdalena Żurawek

Instytut Genetyki Człowieka PAN