

Agnieszka Ziółkowska, dr hab.

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii

Uniwersytet Medyczny w Poznaniu

RECENZJA PRACY DOKTORSKIEJ MGR IRMINY GRZEGOREK

pt. „CHARAKTERYSTYKA KOMÓREK LAM LIMFANGIOLEIOMIOMATOZY PŁUCNEJ”

Poznań, dnia 1.10.2015 r.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska obejmuje cykl trzech publikacji - jednej przeglądowej i dwóch oryginalnych - dotyczących komórek LAM w limfangioleiomiomatozie płucnej. Wszystkie prace cyklu, o łącznej punktacji MNIŚW 55.000 oraz IF równym 4,652, zostały opublikowane w czasopismach z listy filadelfijskiej. Badania finansowane były ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach Projektu dla Młodych Naukowców (Pbmn84).

Praca obejmuje łącznie 77 stron i stanowi przejrzystą konstrukcję. Rozpoczyna się wykazem publikacji składających się na pracę doktorską, streszczeniem w języku polskim i angielskim oraz wstępem, w którym Autorka w sposób zwięzły wprowadza czytelnika w zagadnienia związane z tematyką badań. Wstęp zakończony jest wykazem literatury. Treść publikacji poprzedzona jest podrozdziałem „Założenia i cel pracy”. Praca kończy się podrozdziałem „Podsumowanie i wnioski” oraz „Załączniki”.

Punktem wyjścia do rozważań merytorycznych jest praca pogładowa „LAM cells biology and lymphangioleiomyomatosis” (Grzegorek I, Drozd K, Podhorska-Okolow M, Szuba A, Dziegiel P, *Folia Histochemica et Cytologica* 51: 1-10, 2013), podsumowująca stan wiedzy w momencie podjęcia tematu badań prowadzonych przez Autorkę. Limfangioleiomiomatoza jest rzadką chorobą występującą niemal wyłącznie u kobiet w wieku rozrodczym i występuje w dwóch formach: sporadycznej (S-LAM) lub w przebiegu stwardnienia guzowatego (*Tuberous Sclerosis Complex, TSC -TSC-LAM*). W liczącej 10 stron publikacji (3 ryciny i jedną tabelę), Autorka odnosząc się do aktualnych wówczas prac, przedstawia w przejrzysty sposób fenotyp komórek LAM, patomechanizm limfangioleiomiomatozy płucnej jak również modele eksperymentalne stosowane w

badaniach nad komórkami LAM. Autorka szczególną uwagę zwraca na charakterystykę komórek LAM, ich nadmierny potencjał proliferacyjny wokół oskrzeli, naczyń krwionośnych i limfatycznych, oraz modyfikacji jakie rozplem tych komórek wywołuje w tkance płucnej, prowadząc w konsekwencji do nieodwracalnych zmian i ostatecznie do śmierci pacjentek. Następnie obszernie opisuje patomechanizm tej choroby wywołany mutacją w jednym z genów supresorowych Tuberous Sclerosis Complex *TSC1* lub *TSC2* i zwraca uwagę na konsekwencje dysfunkcji kompleksu TSC1-TSC2 - aktywację szlaku mTOR w komórkach LAM i ich nadmierny potencjał proliferacyjny. Autorka analizuje także metody badawcze stosowane przez innych autorów pozwalające zgłębić podjęty przez Nią temat i słusznie zauważa brak dostępnych komercyjnie linii komórkowych, co jest przyczynkiem do kolejnej pracy cyklu.

Druga praca cyklu „Characterization of cells cultured from chylous effusion from a patient with sporadic lymphangioliomyomatosis” (Grzegorek I, Zuba-Surma E, Chabowki M, Janczak D, Szuba A, Dziegiel P.; *Anticancer Res.* 35: 3341-3352, 2015), ma charakter eksperymentalny, składa się z 11 stron, zawiera 7 rycin (3 mikrografie i 4 wykresy) oraz jedną tabelę. W pracy Autorka przedstawia wyniki badań uzyskanych z użyciem komórek LAM wyizolowanych z płynu opłucnowego 42-letniej pacjentki ze sporadyczną formą limfangioleiomiomatozy płucnej. Pozyskane komórki zostały scharakteryzowane przy użyciu technik immunofluorescencyjnej, cytometrii przepływowej i *image stream system*. Badane komórki charakteryzowały się fenotypem miocytów gładkich (wykazywały ekspresję pośrednich filamentów aktynowych, ekspresja  $\alpha$ -SMA), komórek czerniaka (obecność premelanosomów, immunoreaktywność z przeciwciałem HMB-45) a także endotelialnych komórek limfatycznych (ekspresja podoplaniny). Komórki te wykazywały ponadto ekspresję markerów mezenchymalnych (CD105, CD29, CD90) co sugeruje pochodzenie z macierzystych komórek mezenchymalnych rezydujących w płucach. Oceniona została także ultrastruktura badanych komórek przy użyciu transmisyjnego mikroskopu elektronowego. Wyprowadzona linia komórkowa została nazwana S-LAM1. W kolejnych etapach, przy użyciu metody Real-time PCR array zaobserwowano zwiększony poziom ekspresji 34 genów związanych ze zdolnością do migracji i przerzutowania (EZR, MYH10 i MYLK). Zwieńczeniem pracy było zbadanie wpływu rapamycyny - naturalnego inhibitora szlaku mTOR na potencjał proliferacyjny linii komórkowej S-LAM1. Autorka krytycznie odnosi się do oceny wpływu rapamycyny na proliferację badanych komórek, jednocześnie wskazuje, iż antybiotyk ten może być z powodzeniem stosowany w połączeniu z innymi lekami.

Uwagę zwraca biegłość Autorki w technikach badawczych zastosowanych do scharakteryzowania wyizolowanych a następnie hodowanych komórek LAM.

Trzecia praca, „Immunohistochemical evaluation of pulmonary lymphangioliomyomatosis” (Grzegorek I, Lenze D, Chabowki M, Janczak D, Szółkowska M, Langfort R, Szuba A, Dziegiel P.; *Anticancer Res.* 35: 3353-3360, 2015) jest również pracą oryginalną, liczy 8 stron i zawiera 3 tabele i 3 ryciny (2 mikrografie i jeden wykres). Praca ta opiera się na analizie archiwalnego materiału miąższu płucnego pacjentek pozyskanego

poprzez otwartą biopsję płuca. Pozyskany materiał poddany został ocenie pod kątem zaawansowania histologicznego (*LAM Histology Score - LHS*) i podzielony na dwie grupy: wczesny i zaawansowany LAM. Fakt, iż komórki LAM są heterogenną populacją komórek, o morfologii i wzorze ekspresji genów markerowych zależnych od mikrośrodowiska, skłonił autorkę do poszukiwania nowych strategii diagnostycznych i prognostycznych. Stosowanym dotychczas „złotym standardem” w diagnostyce limfangioleiomiomatozy płucnej jest badanie metodą immunohistochemiczną ekspresji markera czerniaka złośliwego HMB-45, aktyny (alpha-smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA), receptora estrogeny (ER), receptora progesteronu (PR) na poziomie białka. Autorka poszerzyła panel antygenów o białka adhezji komórkowej ( $\beta$ -katenina, E-kadheryna), podoplaninę (D2-40), marker proliferacji komórkowej (MCM3) oraz receptor dla naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR). Najważniejszymi wynikami tych badań jest wytypowanie  $\beta$ -kateniny, E-kadheryny jako markerów komórek LAM o potencjale diagnostycznym a także zwiększony poziom ekspresji ER i EGFR na poziomie białka ( $p < 0,05$ ) w grupie z zaawansowanym LAM.

Prace badawcze, których wyniki przedstawiono w drugiej i trzeciej publikacji cyklu, przeprowadzone były za zgodą Komisji Bioetycznej przy Akademii Medycznej we Wrocławiu (KB 594/2012 i KB 182/2013).

Praca doktorska ma przejrzysty charakter. Pomimo zróżnicowania charakteru publikacji i zastosowanych metod badawczych, praca stanowi zwartą całość a przedstawiane wyniki prezentowane są w logicznej kolejności. Język publikacji i całej pracy jest zrozumiały, ryciny i tabele są adekwatne do treści, a opisy pod nimi umieszczone sprawiają, iż każda z nich stanowi indywidualną całość i jest czytelna. Autorka skupia się na najważniejszych wątkach i przytacza aktualną literaturę.

Na podkreślenie zasługuje fakt, iż Autorka podjęła temat bardzo ważny i aktualny, a prace których jest współautorem zostały zauważone przez innych ekspertów w tej dziedzinie. Praca przeglądowa - pierwsza z cyklu - była pięciokrotnie cytowana (doniesienie kliniczne nie będące częścią cyklu cytowane było sześciokrotnie). Dwie najświeższe prace cyklu (z 2015 roku) nie doczekały się jeszcze cytowań.

W swojej pracy Autorka nie uniknęła jednak nieścisłości edytorskich. W podrozdziale „Cele i założenia pracy” Autorka logicznie sformułowała 3 cele, jednak stosunkowo obszerna forma wpływa na zmniejszenie przejrzystości tego podrozdziału. Istnieje też drobna nieścisłość pomiędzy tytułem tego podrozdziału w spisie treści „Założenia i cel pracy” vs „Cele i założenia pracy”. Podobne uwagi mam do podrozdziału 4. „Podsumowanie i wnioski”. Autorka w sposób bardzo obrazowy podsumowała treść prac cyklu, jednak nie uniknęła powtórzeń, co w pewien sposób maskuje odniesienie wniosków do założeń i celów. Powyższe uwagi nie umniejszają wartości pracy doktorskiej.

Reasumując stwierdzam, iż przedstawiona mi praca doktorska spełnia wymogi formalne stawiane pracom na stopień doktora nauk medycznych. Z związku z powyższym przedkładam wniosek do Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie mgr Irminy Grzegorek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, zważając na aktualność, rzetelność metodologiczną oraz wysoką wartość prezentowanych wyników, wnioskuję o wyróżnienie pracy doktorskiej przez Radę Wydziału.

Agnieszka Ziobrowska