



WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY  
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej

Dr hab. n. med. Olga Ciepiera  
Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej  
Warszawski Uniwersytet Medyczny  
Ul. Banacha 1a, 02-097 Warszawa  
Tel. 22 5992405  
e-mail: olga.ciepiela@wum.edu.pl

Warszawa, 02.01.2020

**Recenzja rozprawy doktorskiej**

**Mgr Małgorzaty Łagiedo-Żelazowskiej**

**pt. „Wpływ aktywnego biologicznie białka A związanego z surfaktantem płucnym (SP-A) na komórki raka płuca A549, Calu-3 oraz fibroblasty płucne CCD-39Lu”**

Promotor pracy: prof. dr hab. Jan Sikora; promotor pomocniczy: dr hab. Mariusz Kaczmarek

Rak płuca stanowi najczęstszą przyczynę zgonów z powodu chorób nowotworowych w grupie mężczyzn w Polsce. U kobiet jest drugą najczęstszą przyczyną zgonów spowodowanych chorobą nowotworową zarówno w Polsce jak i w Stanach Zjednoczonych po nowotworze sutka. Wysoka zachorowalność wiąże się głównie z paleniem tytoniu, chociaż rak gruczołowy płuca często jest diagnozowany u osób, które nie były narażone ani na bierny ani na czynny nikotynizm. Podjęta przez Doktorantkę tematyka dotycząca czynników mogących modyfikować przeżywalność komórek raka płuca pod wpływem specyficznego białka surfaktantu płucnego SP-A jest więc bardzo aktualna i wpisuje się w trend poszukiwania nowych środków terapeutycznych w tym typie nowotworu. Należy nadmienić, że zapadalność na raka płuca może być również związana z narażeniem na oddychanie zanieczyszczonym powietrzem (smog), co w dzisiejszych czasach staje się problemem ogólnoswiatowym. Doniesienia dotyczące związku SP-A z rakiem płuca są jedynie

pojedyncze i nie do końca jednoznaczne, stąd uważam, że podjęcie się przez Doktorantkę zbadania tego zagadnienia jest wysoce uzasadnione, a zastosowane metody bardzo trafne.

Przedstawiona mi do recenzji praca, zawarta w 129 stronach maszynopisu, ma typowy układ dla dysertacji doktorskich. Składa się z 11 głównych rozdziałów, włączając wykaz stosowanych skrótów, spis tabel i rycin oraz streszczenia w języku polskim i angielskim. Piśmiennictwo obejmuje 105 pozycji, z czego 17 prac pochodzi z ostatnich 5 lat. Zdecydowana większość cytowanych prac została opublikowana w czasopismach zagranicznych ujętych w wykazie Journal Citation Reports. W rozprawie piśmiennictwo uporządkowane jest w kolejności cytowania. W pracy Autorka umieściła 57 rycin i 15 tabel, które w sposób wyczerpujący prezentują założenia teoretyczne i wyniki rozprawy.

We wstępie Doktoranta opisuje epidemiologię raka płuca w Polsce i na świecie. W opinii recenzenta warto byłoby przytoczyć najnowsze dane światowe (choćby amerykańskie z 2018 roku). W kolejnych podrozdziałach Doktorantka opisuje metody leczenia raka płuca, skupiając się na immunoterapii i leczeniu ukierunkowanym molekularnie, co ma ścisły związek z badanym przez nią zagadnieniem. Podrozdział dotyczący nowotworowego wysięku opłucnowego według recenzenta powinien być nieco szerzej opisany, uwzględniając mechanizmy jego generacji, szczególnie, że materiał biologiczny z którym Doktorantka pracowała to właśnie białko izolowane z płynów wysiękowych. Aspekt immunologiczny - odpowiedź układu odpornościowego w przebiegu raka płuca - został opisany dokładnie, choć trzeba przyznać, że Autorka nie uniknęła kilka drobnych błędów. Zwraca uwagę podrozdział dotyczący receptorów rozpoznających wzorce i lapsus językowy opisujący „bakterie NOD-podobne”. Zapewne znany jest Doktorantce fakt, że receptory NLR (NOD-like receptors) rozpoznają cząsteczki PAMP występujące na powierzchni lub wewnątrz patogenów, głównie bakterii, a niefortunny użyte sformułowanie jest jedynie daleko idącym skrótem myślowym. W podrozdziałach 4.1. i 4.2. opisujących PAMP i DAMP Autorka w tytule podrozdziału użyła sformułowania „wzorce związane z zagrożeniem” w odniesieniu do PAMP, chociaż w jego treści właściwie opisuje tę grupę cząsteczek, natomiast w podrozdziale o DAMP zamiennie używa słów „danger” i „damage”. W przypadku przygotowywania publikacji sugeruję, aby trzymać się jednej nomenklatury dotyczącej DAMP, czyli *damage-associated molecular patterns*. W rozdziale dotyczącym surfaktantu, opisując skład białkowy tej substancji Autorka pisze o „zanieczyszczonych białkach osocza”. Z czystego obowiązku

recenzenta zwracam uwagę, że to nie białka osocza wchodzące w skład surfaktantu są zanieczyszczone, ale sama frakcja białkowa substancji obniżającej napięcie powierzchniowe pęcherzyków płucnych składa się z białek specyficznych i białek osocza.

W oparciu o wstęp teoretyczny Autorka postawiła sobie cel badawczy, którego realizacja była oparta o 3 główne zadania:

1. Określenie czy i w jaki sposób białko SP-A wpływa na cykl komórkowy komórek ustalonych linii ludzkiego raka płuca A549 i Calu-3 oraz ustalonej linii ludzkim immortalizowanych fibroblastów płucnych CCD-39Lu
2. Zbadanie czy istnieje zależność pomiędzy stężeniem białka SP-A a ekspresją receptorów TLR4 na komórkach ustalonego raka płuca A549 i Calu-3 oraz ustalonej linii ludzkim immortalizowanych fibroblastów płucnych CCD-39Lu
3. Ocenę ekspresji wybranych genów kodujących białka związane z apoptozą, stanem zapalnym oraz progresją nowotworu w komórkach ustalonej linii ludzkiego raka płuca A549 poddanych stymulacji białkiem SP-A.

W pierwszym etapie pracy Autorka opisuje proces ekstrakcji białka SP-A z wysięków opłucnowych pobranych od 34 pacjentów poddawanych zabiegowi torakocentezy. Czy Doktorantka brała osobiście udział w procesie oczyszczania białka? W rozdziale Materiały i Metody brak jest informacji o pozytywnej opinii właściwej Komisji Bioetycznej, dotyczącej pobrania materiału od pacjentów jak również świadomej zgody uczestników badania na jego wykorzystanie w celach naukowych. Materiał został, zgodnie z informacją zawartą w pracy, pobrany w trakcie realizacji pracy magisterskiej przez Doktorantkę, jednak nie zwalnia to Autorki z podania informacji o uzyskaniu opinii właściwej Komisji Bioetycznej dotyczącej badania.

Metody hodowli komórkowej, analizy cytometrycznej, immunofluorescencji bezpośredniej oraz analizy molekularnej zostały przez Doktorantkę wyczerpująco opisane, jednoznacznie podkreślając biegłość Autorki w ich wykorzystywaniu. Zwracam uwagę na nazwę zastosowanego inhibitora TLR3 – Calbiochem, to nazwa producenta inhibitora, wchodzącego w grupę Merck Milipore, a użyta substancja, zgodnie z numerem katalogowym to TLR3/dsRNA Complex Inhibitor. Szkoda, że Autorka nie dodała ryciny przedstawiającej analizę cytometryczną cyklu komórkowego badanych komórek – wzbogaciłoby to graficznie recenzowaną rozprawę.

Wyniki pracy Doktorantka przedstawiła bardzo przejrzysto na niemal 40 stronach maszynopisu, prezentując graficzne wyniki w formie 39 rycin i 6 tabel. Pod kątem graficznym wyniki są niezwykle czytelne i opracowane bardzo starannie. Zastosowała również właściwe metody analizy statystycznej, wykazując dużą wiedzę dotyczącą prawidłowej oceny statystycznej uzyskiwanych wyników.

Na podstawie przeprowadzonych badań Autorka zauważyła, że białko SP-A powoduje istotne zwiększenie odsetka martwych komórek linii A549, a zależność ta jest związana z czasem inkubacji komórek z badanym białkiem. Nieco odmienne wyniki Doktoranta uzyskała oceniając wpływ białka SP-A na komórki linii Calu-3 – w tym przypadku Autorka obserwowała również zwiększenie się odsetka komórek martwych pod wpływem inkubacji z białkiem SP-A, jednak proces ten był zależny nie tylko od czasu ale również stężenia zastosowanego czynnika. Badania na prawidłowych fibroblastach pozwoliły Doktorantce zaobserwować, że SP-A nie powoduje zwiększenia odsetka komórek martwych a zwiększa odsetek komórek w fazie G0/G1 cyklu komórkowego. Dzięki przeprowadzonym badaniom Autorka zrealizowała pierwszy z 3 głównych celów badawczych swojej pracy.

W trakcie realizacji drugiego celu badawczego Doktorantka wykazała, że SP-A powoduje wzrost ekspresji receptora TLR4 na komórkach linii A549 oraz Calu-3, jednak efekt ten nie jest zależny od czasu inkubacji komórek z badanym czynnikiem. Na rycinach 22 i 24 brakuje opisu przedstawionych histogramów (opis osi X, jakie stężenie SP-A powoduje tak wysoki wzrost ekspresji TLR4). Odmienne wyniki Autorka uzyskała badając wpływ SP-A na prawidłowe komórki linii CCD-39Lu. Białko SP-A nie powodowało zmian ekspresji TLR4, jednak wpływało istotnie na ekspresję TLR2 i TLR3. Ciekawa wydaje się obserwacja kierunków zmian ekspresji badanych receptorów pod wpływem najwyższych zastosowanych stężeń SP-A w prawidłowych fibroblastach ludzkich.

Ostatni postawiony przed Doktorantką cel badawczy został osiągnięty dzięki analizie ekspresji genów dla badanych receptorów TLR, czynników Bcl-2 i Bax, TTF-1 oraz cytokin prozapalnych IL-6, IFN- $\gamma$  oraz TNF- $\alpha$  w komórkach linii A549 hodowanych z różnymi stężeniami i w różnych czasach inkubacji z SP-A. Na podstawie przeprowadzonych badań Doktorantka zauważyła brak istotnego wpływu SP-A na ekspresję transkryptów dla wszystkich badanych czynników, jednak ekspresja genu dla IL-6 wykazywała trend wzrostowy wraz z zastosowaniem wyższych stężeń SP-A.

Autorka podsumowała swoje wyniki w rozdziale „Wnioski”, tym samym w pracy zabrakło właściwych wniosków z przeprowadzonych doświadczeń. Jednak w dyskusji Doktorantka wyraźnie wnioskuje, że uzyskane przez nią wyniki mogą przełożyć się na lepsze zrozumienie mechanizmów immunologicznych zależnych od składników surfaktantu w raku płuca oraz mogą stać się podstawą do zastosowania immunoterapii opartej o białko SP-A w terapii tego rodzaju nowotworu.

W rozdziale „Dyskusja” Autorka próbuje odnieść uzyskane przez siebie wyniki do wyników innych grup badawczych. Dyskusja prowadzona jest w sposób logiczny i spójny, a Doktorantka wykazała się w niej wiedzą dotyczącą najnowszych badań w dziedzinie raka płuca i wpływu SP-A na mikrośrodowisko guza. Podejmując się pisania tego rozdziału Doktorantka niewątpliwie postawiła przed sobą trudne zadanie, ponieważ przeprowadzone przez nią badania są wysoce innowacyjne i nie ma za wielu doniesień badających podobny problem, z którymi mogłaby dyskutować. Autorka krytycznie analizuje uzyskane przez siebie wyniki, wskazując na konieczność przeprowadzenia głębszych badań wyjaśniających zmiany obserwowane w komórkach raka płuca pod wpływem zastosowanego SP-A. O dojrzałości naukowej Doktorantki świadczy fakt, że z dużą ostrożnością interpretuje uzyskane przez siebie wyniki. Jednocześnie próbuje znaleźć wyjaśnienie dla uzyskanych przez siebie, wydawałoby się, sprzecznych rezultatów analizy ekspresji TLR4 w badanych komórkach oraz zauważa, że plejotropowe działanie IL-6 nie pozwala jednoznacznie określić czy jej działanie na komórki raka płuca jest korzystne czy nie.

Z czystego obowiązku recenzenta muszę zauważyć, że pomimo doskonałego stylu pracy, którą czyta się z zainteresowaniem i zrozumieniem, Autorka nie uniknęła nielicznych błędów interpunkcyjnych i literowych. Jednak, pragnę podkreślić, że w żaden sposób nie umniejsza to wysokiej wartości naukowej przedstawionej mi do recenzji pracy.

Podsumowując, rozprawę na stopień naukowy doktora nauk medycznych mgr Małgorzaty Łagiedo-Żelazowskiej oceniam bardzo dobrze. Doktorantka wykazała dobre przygotowanie teoretyczne, opanowane warsztatu badawczego oraz umiejętność analizy uzyskanych wyników. Wyniki rozprawy mogą stać się podstawą do opracowania nowych metod terapeutycznych w raku płuca i powinny zostać przedstawione w formie pełnej publikacji międzynarodowemu gremium naukowemu.



W mojej ocenie rozprawa spełnia warunki określone w artykule 13 Ustawy z dnia 14.03.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, dlatego wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego I Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu o dopuszczenie pani mgr Małgorzaty Łagiedo-Żelazowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Dr hab. n. med. Olga Ciepiela

Warszawa, 02.01.2020