

Acceptacja
HDM

Recenzja

rozprawy doktorskiej lek. Moniki Siedleckiej

Pod tytułem: **Badanie apoptozy w stwardnieniu guzowatym**

Recenzję sporządziłam zgodnie z Uchwałą Rady Dyscypliny Nauk Medycznych WUM z 21 marca 2019 roku. Rozprawa wraz z listem przewodnim z 4 lipca 2024 roku została mi przesłana drogą elektroniczną 17 września 2024 roku.

Praca doktorska została wykonana w Katedrze i Zakładzie Histologii i Embriologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, pod kierunkiem dr hab. n.med. Ryszarda Galusa (promotor) i dr inż. Anny Sobiepanek (promotor pomocniczy).

Rozprawę stanowi monografia naukowa złożona ze wstępu, przedstawienia założeń i celów pracy, materiałów i zastosowanych metod, uzyskanych wyników, dyskusji oraz wniosków i spisu piśmiennictwa. Doktorantka załączyła także kopię uchwały Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym, zawierającą pozytywną opinię o projekcie badania (Uchwała nr BB/122/2018), streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz rycin, tabel i wykresów oraz skrótów. Całość liczy 159 stron.

Stwardnienie guzowate (Tuberous Sclerosis Complex; TSC) jest rzadką wielonarządową chorobą uwarunkowaną genetycznie, której osiowymi objawami są zmiany dysplastyczne i łagodne nowotwory rozwijające się przede wszystkim w mózgu, sercu, płucach, nerkach, wątrobie, skórze i siatkówce oka. Schorzenie występuje u mniej więcej 1 na 6 tysięcy żywo urodzonych noworodków, z których mniej więcej 30% ma mutacje w genie *TSC1*, a około 60% - w genie *TSC2*. U kilku procent pacjentów nie udaje się zidentyfikować mutacji. Zarówno patologiczne warianty w genie *TSC1*, jak i w *TSC2* wiążą się z niewystarczającym hamowaniem szlaku mTOR przez heterodimer tuberyna – hamartyna. Pierwszym objawem TSC są zazwyczaj guzy serca, rozwijające się już u płodu, oraz zmiany w mózgu. Zmiany te u większości pacjentów z TSC powodują padaczkę, zwykle rozwijającą się już u niemowląt i często lekooporną. Interesującą cechą choroby jest fakt, że guzy serca samoistnie się zmniejszają u dzieci z TSC; są to jednak jedyne guzy w tym schorzeniu, które ulegają inwolucji. Wszystkie pozostałe guzy mają tendencję do wzrostu, a dynamika tego wzrostu jest bardzo zróżnicowana. W ostatnich kilkunastu latach do leczenia zmian

guzowatych związanych z TSC wprowadzono inhibitory mTOR, w tym ewerolimus i rapamycynę. Leki te cechują się wysoką skutecznością, jednak żaden z nich nie powoduje całkowitego wyleczenia guza. Po zaprzestaniu terapii zmiany guzowate nawracają. Nie ma obecnie farmakoterapii trwale leczących TSC lub związane z nią guzy.

Celem rozprawy doktorskiej lek. Moniki Siedleckiej było zbadanie procesów programowanej śmierci komórki w zmianach guzowatych związanych z TSC oraz w liniach komórkowych wyprowadzonych z takich zmian. Doktorantka, opierając się na dostępnych danych literaturowych, założyła, że procesy apoptozy w TSC są w złożony sposób zaburzone.

Zarówno podjęty przez Doktorantkę temat, dobrze opisany we wstępie, jak i założenia pracy mają mocne uzasadnienie i stanowią niewątpliwie mocną stronę rozprawy. Lek. Monika Siedlecka odpowiednio dobrała piśmiennictwo i wykazała się umiejętnością jego właściwego wykorzystania.

Siłą rozprawy jest także dobór metod badawczych i ich szczegółowy opis, którego fragmenty jednak, na przykład opis procedury izolacji fibroblastów oraz opis hodowli komórkowych, znalazły się także w opisie wyników.

Doktorantka zastosowała szeroki wachlarz technik eksperymentalnych, obejmujący zakresy biologii molekularnej i komórkowej. Być może niektóre części rozdziału dotyczącego metod są zbyt obszerne, na przykład zbędne wydaje się tłumaczenie działania mikroskopu fluorescencyjnego. W opisie metod brakuje natomiast uzasadnienia wyboru użytych substancji mających hamować rozwój hodowli komórkowych. Doktorantka zastosowała staurosporynę, wenetoklaks i doksorubicynę, jednak nie wskazała przyczyn tego właśnie wyboru. Korzystne także byłoby umieszczenie w opisie metod schematu przebiegu prac wraz ze wskazaniem kamieni milowych. Nie wiadomo na przykład, dlaczego Doktorantka część eksperymentów przeprowadziła tylko z użyciem doksorubicyny. Uzasadnienie zawarte na stronie 114 jest bardzo lakoniczne („Szczególnie doksorubicyna wykazała znaczący wpływ na komórki po dłuższym czasie inkubacji”).

Na docenienie zasługuje fakt samodzielnego uzyskiwania materiału badawczego od pacjentów w czasie pracy klinicznej, co świadczy o niewątpliwym zaangażowaniu i dociekliwości także przy wykonywaniu praktyki lekarskiej przez Doktorantkę.

Problematyczny jest fakt włączenia do doktoratu materiału pochodzącego od dwojga pacjentów, przy czym tylko z materiału jednej pacjentki Doktorantka wyprowadziła hodowlę komórkową z guzka okołopaznokciowego i skóry niezmiętej chorobowo. Pierwszą wątpliwość budzi sama liczebność próby – jedna próbka to z pewnością zbyt mało, aby

uzyskane wyniki mogły być reprezentatywne dla całej populacji chorych. Poza tym, nie wiadomo, czy próbka skór niezmienionej rzeczywiście była próbką skóry zdrowej. Nie ustalono, czy pacjentka miała stwierdzoną mutacje w genie *TSC1* czy *TSC2*, nie wiadomo również, czy mutacje były obecne w badanych tkankach. Pobrana niezmieniona na pierwszy rzut oka skóra mogła być genetycznie zupełnie zdrowa (jeśli pacjentka była mozaiką) lub zmutowana w jednym allelu. Fakt, że pacjentka miała chorego na TSC syna nie przesądza w żaden sposób sprawy – istotniejszy byłby wywiad dotyczący jej rodziców, a najkorzystniejsze byłoby przeprowadzenie badania genetycznego pobranych próbek. Brakuje także analizy aktywacji szlaku mTOR; badanie takie przeprowadzono jedynie dla materiału archiwalnego (guzy SEGA i włókniaki okołopaznokciowe).

Rozdział poświęcony wynikom, jak wspomniano wyżej, zawiera obszerne fragmenty metodyki. Podzielony jest na części dotyczące hodowli komórkowych i badań morfologicznych oraz znacznie krótszą część zawierającą opis badań lizatów tkankowych. Wyniki dotyczące wpływu doksorubicyny są bardzo interesujące, jednak z zastrzeżeniem dotyczącym wykonania eksperymentów na jednej próbce. Wyniki opatrzone licznymi rycinami i wykresami. Podpisy pod rycinami są nieco zbyt lakoniczne; na przykład rycina 19 przedstawia barwienia, a 16 obserwacji komórek. Część rycin nie jest kompletna; na przykład rycina 27 zawiera wyniki tylko dwóch guzów SEGA, a w tekście zabrakło informacji, czy dla wszystkich guzów uzyskano takie same wyniki. Wątpliwość jest o tyle istotna, że w tekście są zawarte sprzeczne lub niejasne informacje: na stronie 128 Doktorantka pisze o 5 analizowanych guzach SEGA, a na stronie 129 podaje, że „w żadnej z 3 analizowanych próbek ...”. Analiza obrazów żeli umieszczonych na rycinie 28 także wskazuje, że przynajmniej dwa guzy SEGA różniły się pod względem aktywacji niektórych składowych szlaku mTOR. Mimo tych wątpliwości uważam, że część poświęcona białkom regulującym apoptozę jest niezwykle interesująca i warto byłoby, aby Doktorantka w przyszłości pogłębiła badania w tym zakresie.

W dyskusji Doktoranta omówiła dane literaturowe dotyczące komórkowych modeli TSC, wspominając o uwarunkowaniach genetycznych i utracie heterozygotyczności. Duży i bardzo ciekawy fragment Dyskusji jest poświęcony receptorowi kwasu retinowego. Brakuje jednak podania bardziej bezpośredniego związku z pracą Doktorantki. Innym bardzo ciekawym fragmentem dyskusji jest część poświęcona metaloproteinazom. W obu tych częściach, jak i w pozostałych fragmentach dyskusji Doktoranta wykazała się szeroką znajomością literatury przedmiotu oraz sprawnym posługiwaniem się odpowiednimi cytowaniami. W sumie w rozprawie zacytowano 228 artykułów naukowych. Zabrakło jednak

przedyskutowania słabych i mocnych stron rozprawy, a to niewątpliwie ułatwiłoby sformułowanie wniosków.

Wnioski są bardzo liczne i wydaje się, że część stanowi raczej podsumowanie wyników. Można byłoby więc liczbę ich ograniczyć.

Całość rozprawy napisana jest jasno i przejrzysto. Nieliczne błędy stylistyczne i interpunkcyjne nie zmniejszają ogólnej wartości pracy.

Podsumowując: założenia pracy Doktorantki oraz opanowanie przez nią warsztatu w zakresie samodzielnego wykonywania badań, a także umiejętność korzystania z literatury specjalistycznej przy omawianiu wyników własnych badań oceniam pozytywnie. Rozprawa ma uchybienia w częściach obejmujących omówienie metodologii i wyników, jednak w całości spełnia warunki określone w art.13 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 z późn. zm.) w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018r. poz. 1669 z późn. zm.)”. W związku z tym przedstawiam Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych WUM wniosek o dopuszczenie lek Moniki Siedleckiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. n. med.
Katarzyna Koralska-Łoźwiak
specjalista II stopnia
neurolog dziecięcy
1193674