



**ZAŁĄCZNIK NR 2**

## **AUTOREFERAT**

**Dr n. med. Joanna M. Łotowska**

**Uniwersytet Medyczny w Białymstoku  
Zakład Patomorfologii Lekarskiej**

**Białystok 2019**

## **Załącznik nr 2**

do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego z dnia 25.03.2019 r.

### **1. Dane osobowe:**

**Imię i nazwisko:** Joanna Maria Łotowska

**Miejsce pracy:** Zakład Patomorfologii Lekarskiej

Katedra Biostruktury

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

ul. Waszyngtona 13

15-269 Białystok

**Dane kontaktowe:** Zakład Patomorfologii Lekarskiej

Katedra Biostruktury

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

ul. Waszyngtona 13

15-269 Białystok

Tel.: 0048-85-7485945

Fax.: 0048-85-7485990

Tel. kom.: 516 273 337

### **2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej:**

- 06.2007 Akademia Medyczna w Białymstoku, Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim, dyplom lekarza
- 06.2012 Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim, uzyskanie stopnia doktora nauk medycznych na podstawie rozprawy doktorskiej: „*Komórki gwiaździste wątroby u dzieci z przewlekłym zapaleniem wątroby typu B*” (rozprawa wyróżniona przez recenzentów)

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Dariusz M. Lebensztein (Uniwersytet Medyczny w Białymstoku)

Recenzenci w przewodzie doktorskim:

Prof. dr hab. n. med. Andrzej Gabriel (Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach)

Prof. dr hab. n. med. Bogusław Musiatowicz (Uniwersytet Medyczny w Białymstoku)

- 09.2012 Cytologia Exfoliatywna Dla Patomorfologów - dyplom ukończenia kurs
- 04.2015 Centrum Egzaminów Medycznych, Łódź, dyplom specjalisty w dziedzinie patomorfologii

### **3. a. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:**

- 2007-2008 – Lekarz stażysta w Uniwersyteckim Szpitalu Klinicznym w Białymstoku i wolontariusz w Zakładzie Patomorfologii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku
- 12.2008-03.2009 – Lekarz rezydent w Zakładzie Patomorfologii SPSK Nr 1 im. prof. T. Sokołowskiego Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie
- 2009-2014 – Lekarz rezydent w Zakładzie Patomorfologii Ogólnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku
- od 2015 - do chwili obecnej – Asystent naukowo-dydaktyczny w Zakładzie Patomorfologii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku
- od 2016 r. - Akademicki Ośrodek Diagnostyki Patomorfologicznej i Genetyczno-Molekularnej w Białymstoku, specjalista patomorfolog

### **3. b. Podsumowanie dorobku naukowego:**

Liczba wszystkich publikacji: **26**

Liczba publikacji wchodzących w skład habilitacji: **5**

Streszczenia konferencyjne: **50**

Udział w projektach badawczych:

a) Kierownik projektów MNiSW: **2**

b) Wykonawca: **7**, w tym **1** projekt międzywydziałowy i **2** międzyuczelniane

Sumaryczny IF opublikowanych artykułów (JCR): **25,839**

Sumaryczna punktacja KBN/MNiSW opublikowanych prac: **393**

Liczba cytowań wg bazy Web of Science Core Collection: **93**

Liczba cytowań wg bazy Web of Science All Databases: **100**

**Indeks Hirscha wg bazy Web of Science: 6**

**4. Wskazanie osiągnięcia 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.2016 poz. 882 ze zm. W Dz. U. z 2016 poz. 1311.):**

**a. Tytuł osiągnięcia naukowego**

Osiągnięciem naukowym będącym podstawą do wnioskowania o uzyskanie stopnia naukowego doktora habilitowanego jest cykl publikacji powiązanych tematycznie pod tytułem:

**„Badania ultrastrukturalne wybranych populacji komórek wątroby w niektórych przewlekłych chorobach zapalnych wątroby u dzieci i w doświadczalnym modelu włóknienia”**

Opracowanie wydzielonego zagadnienia jest indywidualnym wkładem do hepatologii wieku rozwojowego na temat udziału wybranych populacji komórek wątroby ocenianych na poziomie ultrastruktury w morfogenezie niektórych przewlekłych zapaleń wątroby u dzieci a także w procesie włóknienia narządu w doświadczalnym modelu włóknienia żółciowego. Potwierdza potrzebę szerszego stosowania badań mikroskopowo-elektronowych w diagnostyce ocenianych przewlekłych patologii wątroby u pacjentów wieku rozwojowego a także w badaniach nad eksperymentalną fibrogenezą.

**b. Autorzy, tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, recenzent wydawniczy:**

1. *Lotowska JM*, Sobaniec-Lotowska ME, Lebensztejn DM. The role of Kupffer cells in the morphogenesis of nonalcoholic steatohepatitis - ultrastructural findings. The first report in pediatric patients. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 2013, 48(3), 352-357.

**Impact Factor: 2,329; punktacja MNiSW: 25**

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na: stworzeniu koncepcji pracy, gromadzeniu materiału badawczego, jego analizie ultrastrukturalnej, archiwizacji baz danych, interpretacji uzyskanych wyników, zbieraniu i przeglądzie piśmiennictwa, przygotowaniu wniosków badawczych i tekstu manuskryptu, redakcji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 90%.

2. *Lotowska JM*, Sobaniec-Lotowska ME, Bockowska SB, Lebensztejn DM. Pediatric non-alcoholic steatohepatitis: The first report on the ultrastructure of hepatocyte mitochondria. *World Journal of Gastroenterology* 2014, 20(15), 4335-4340.

**Impact Factor: 2,369; punktacja MNiSW: 25**

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na: stworzeniu koncepcji artykułu, gromadzeniu materiału badawczego oraz jego ocenie ultrastrukturalnej, analizie i interpretacji uzyskanych

wyników, przygotowaniu wniosków badawczych i tekstu manuskryptu, redakcji manuskryptu, a także zapewnieniu integralności całego badania. Mój udział procentowy szacuję na 85%.

**3. Lotowska JM, Sobaniec-Lotowska ME, Daniluk U, Lebensztejn DM.** Glassy droplet inclusions within the cytoplasm of Kupffer cells: A novel ultrastructural feature for the diagnosis of pediatric autoimmune hepatitis. *Digestive and Liver Disease*, 2017, 49(8), 929-933.

**Impact Factor: 3,287; punktacja MNiSW: 25**

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na: stworzeniu koncepcji pracy, gromadzeniu materiału badawczego oraz jego ocenie ultrastrukturalnej, archiwizacji baz danych, analizie i interpretacji uzyskanych wyników, zbieraniu i przeglądzie piśmiennictwa, przygotowaniu wniosków badawczych i tekstu manuskryptu, redakcji manuskryptu, a także zapewnieniu spójności całego badania. Mój udział procentowy szacuję na 85%.

**4. Lotowska JM, Sobaniec-Lotowska ME, Lebensztejn DM, Daniluk U, Sobaniec P, Sendrowski K, Daniluk J, Reszec J, Debek W.** Ultrastructural characteristics of rat hepatic oval cells and their intercellular contacts in the model of biliary fibrosis. New insights into experimental liver fibrogenesis. *Gastroenterology Research and Practice*, 2017 (in press; Article ID 2721547, 11pp) (2017:2721547 doi: 10.1155/2017/2721547).

**Impact Factor: 1,859; punktacja MNiSW: 20**

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na: stworzeniu koncepcji artykułu, gromadzeniu materiału badawczego oraz jego ocenie ultrastrukturalnej, interpretacji uzyskanych wyników, przygotowaniu wniosków badawczych i tekstu manuskryptu, redakcji manuskryptu, a także zapewnieniu spójności całego badania i częściowym pozyskaniu funduszy na badania. Mój udział procentowy szacuję na 60%.

**5. Lotowska JM, Sobaniec-Lotowska ME, Sobaniec P, Lebensztejn DM.** Liver sinusoidal endothelial cells in morphogenesis of pediatric autoimmune hepatitis. Ultrastructural characteristics - a novel report. *Polish Journal of Pathology*, 2018, 69(4), 327-334.

**Impact Factor: 0,865; punktacja MNiSW: 15**

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na : stworzeniu koncepcji pracy, gromadzeniu materiału badawczego oraz jego ocenie ultrastrukturalnej, analizie i interpretacji uzyskanych wyników, zbieraniu i przeglądzie piśmiennictwa, przygotowaniu wniosków badawczych i tekstu manuskryptu, redakcji manuskryptu, zapewnieniu integralności całego badania, częściowym pozyskaniu funduszy na badania. Mój udział procentowy szacuję na 85%.

**Łączna wartość bibliometryczna wybranych publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe:**

Sumaryczny współczynnik oddziaływania (IF) wg bazy *Journal of Citation Reports (JCR)* – **10,709** punktów

Punktacja KBN/MNiSW – **110** punktów

**c. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania:**

**Opis osiągnięcia naukowego:**

Podstawę rozprawy habilitacyjnej tworzy cykl pięciu oryginalnych, pionierskich publikacji stanowiących uzupełnienie obecnego stanu wiedzy na temat obrazu ultrastrukturalnego wybranych populacji komórek wątroby ocenianych w materiale oligobiopsyjnym pobranym od dzieci z niealkoholowym stłuszczeniowym zapaleniem wątroby (ang. *nonalcoholic steatohepatitis* – **NASH**) i autoimmunizacyjnym zapaleniem wątroby (ang. *autoimmune hepatitis* – **AIH**) (łącznie 4 prace) a także w modelu doświadczalnym wtórnego włóknienia żółciowego (ang. *biliary duct ligation model* – model BDL) (1 praca). Jedno opracowanie poświęcone było ultrastrukturze **hepatocytów** w NASH; w pozostałych pracach morfologiczno-klinicznych koncentrowałam się na komórkach wchodzących w skład tzw. **nieparenchymalnych komórek wątroby** (ang. *nonparenchymal hepatic cells* – **NPCs**) (tj. **komórkach Browicza-Kupffera/makrofagach** – **B.-KCs/MPs**, **komórkach gwiazdzistych wątroby** – ang. *hepatic stellate cells* - **HSCs** i **komórkach śródbłonki naczyń zatokowych wątroby** – ang. *liver sinusoidal endothelial cells* - **LESCs**) i ich roli w morfogenezie w/w chorób. Natomiast praca doświadczalna nad procesem fibrogenyzy i rozwoju włóknienia wątroby dotyczyła ultrastruktury populacji **komórek macierzystych/owalnych wątroby (HPCs/oval cells)** jak również **NPCs**.

W prezentowanych publikacjach przedstawiłam nowe, nie opisywane dotychczas w hepatopatologii, wykładniki morfologiczne oceniane na **poziomie mikroskopii elektronowej transmisyjnej**, patognomoniczne dla badanego przewlekłego, współistniejącego z procesem fibrogenyzy, schorzenia wątroby. Powyższe prace stanowią kontynuację moich wcześniejszych badań nad rolą populacji NPCs i HPCs w morfogenezie włóknienia wątroby u dzieci z przewlekłymi zapaleniami tego narządu.

Przedstawione, jako osiągnięcie naukowe, w postępowaniu habilitacyjnym publikacje są wynikiem badań przeprowadzonych w trakcie realizacji projektów badawczych z zakresu hepatopatologii w ramach prac statutowych finansowanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego i przeprowadzonych w Zakładzie Patomorfologii Lekarskiej UMB. Autor habilitacyjnego cyklu publikacji był głównym wykonawcą tych projektów badawczych i kierownikiem dwóch projektów.

## **Wprowadzenie:**

Od wielu lat badania morfologiczno-kliniczne i doświadczalne nad **przewlekłymi zapaleniami wątroby (pzw)**, głównie ze względu na poważne konsekwencje tych patologii o charakterze progresywnego włóknienia/marskości narządu, są przedmiotem zainteresowań wielu ośrodków badawczych na całym świecie.

**Wiodącym celem** naukowym prezentowanego cyklu publikacji było pogłębienie wiedzy na temat roli niektórych populacji komórek wątroby w morfogenezie wybranych pzw u dzieci, tj. NASH i AIH (hepatocytów w przypadku NASH i NPCs w przypadku NASH i AIH) a także w procesie fibrogenezy analizowanym w modelu doświadczalnym wtórnego włóknienia żółciowego typu BDL. Oprócz aspektów poznawczych wyniki uzyskanych badań mogą mieć zastosowanie w praktyce klinicznej, bowiem prawidłowa diagnoza histopatologiczno-kliniczna pzw poszerzona o ocenę na poziomie mikroskopii elektronowej transmisyjnej (TEM) i wdrożenie efektywnych terapii znacznie ograniczają skutki choroby, zwłaszcza progresję włóknienia narządu.

Należy podkreślić, że literatura hepatologiczna dotycząca diagnostyki ultrastrukturalnej pzw, w tym NASH i AIH, jest dość ograniczona i głównie odnosi się do chorych dorosłych. W dostępnych bazach bibliograficznych brak jest podobnych opracowań dotyczących pacjentów pediatrycznych, co zachęciło mnie do zajęcia się tą tematyką.

Spośród różnych etiologii pzw na plan pierwszy wysuwają się: zakażenia wirusami hepatotropowymi (HBV, HCV, HDV), przewlekły alkoholizm, niektóre choroby metaboliczne wątroby (np.: choroba Wilsona, niedobór alfa 1- antytrypsyny/antyproteazy), niealkoholowe stłuszczeniowe zapalenie wątroby – NASH i choroby autoimmunizacyjne (syn. choroby autoimmunologiczne) (np. autoimmunizacyjne zapalenie wątroby - AIH), a także przewlekłe stosowanie leków (np.: izoniazyd, alfa-metylodopa, metotreksat). Czynniki uszkadzające tkanki, takie jak: infekcje wirusowe, trucizny, uraz mechaniczny mogą powodować stan zapalny, którego naturalnym zejściem jest włóknienie – niezbędny element procesu gojenia się uszkodzonych tkanek i narządów. Jednak w przypadku wątroby przewlekłe zapalenie tego narządu stanowi

główną przyczynę postępującego włóknienia, do marskości i niewydolności włącznie. Marskość wątroby jest jedną z ważniejszych przyczyn kalectwa, pierwotnych nowotworów złośliwych wątroby i przedwczesnych zejść śmiertelnych (jedna z dziesięciu najczęstszych przyczyn zgonu), generując duże koszty społeczne.

Morfologiczne wykładniki postępującego uszkodzenia wątroby w przebiegu pzw to: utrzymująca się martwica okołowrotna i martwica mostkująca z towarzyszącym odkładaniem się tkanki łącznej włóknistej. Proces intensywnej fibroplazji kolagenowej stanowi charakterystyczną cechę niszczenia narządu. Postępująca utrata hepatocytów i progresywne włóknienie prowadzą do marskości, której najistotniejszym morfologicznym wyrazem jest intensywne włóknienie przęsłowe z obecnością guzków regeneracyjnych.

Cztery piąte zdrowej wątroby człowieka wypełniają komórki a jedną piątą stanowią przestrzenie okołozatokowe, tj. przestrzenie Dissego. Komórki wątroby obejmują komórki nabłonkowe, w skład których wchodzi komórki **parenchymalne** (mięszkowe), tj. **hepatocyty** – podstawowy składnik komórkowy budujący narząd (około 70% wszystkich komórek narządu) i **cholangiocyty** (komórki wyściełające wewnątrzwątrobowe drogi żółciowe - około 3% całej populacji komórek wątrobowych). Pozostałe ok. **27%** stanowią nie nabłonkowe komórki wątroby, tzw. **nieparenchymalne** (ang. *hepatic nonparenchymal cells – NPCs*), wśród których wyróżnia się: **komórki śródbłonka** (około 40% NPCs), **komórki gwiaździste** (ang. *hepatic stellate cells - HSCs* - około 20% NPCs), **komórki Browicza-Kupffera (B.-KCs)** (około 20% NPCs) i niejednorodną populację limfocytów wewnątrzwątrobowych (około 20% NPCs). Największy odsetek w obrębie komórek limfocytarnych wewnątrzwątrobowych stanowią komórki NK-T (ang. *Natural Killer – T*), NK (ang. *Natural Killer*) oraz komórki TCR  $\alpha \beta$  (ang. T-cell receptor  $\alpha \beta$ ) (Mehal, Azzaroli 2001) (1).

Od niedawna w centrum zainteresowań licznych ośrodków hepatologicznych na całym świecie jest szczególna populacja komórkowa, obecna w pełni dojrzałej wątrobie, określana komórkami rezerwowymi (ang. *hepatic reserve cells*), **multipotencjalnymi komórkami macierzystymi/owalnymi wątroby**; komórkami pierwotnymi wątroby lub komórkami pnia (ang. *hepatic progenitor/oval cells – HPCs/oval cells; hepatic stem cells*). Stanowią one od **1 - 3 %** wszystkich komórek wątroby i zlokalizowane są głównie w przestrzeniach wrotnych i okołowrotnych zrazików wątrobowych (Guettier 2005; Yovchev 2008; He, Feng 2011) (2, 3, 4).

**Badania zawarte w publikacjach stanowiących osiągnięcie naukowe zostały podzielone na 3 części:**



a/ Pierwszy etap obejmował analizę ultrastrukturalną populacji hepatocytów i komórek B.-Kupffera/MPs u dzieci z NASH

b/ Drugi etap dotyczył oceny ultrastrukturalnej populacji komórek B.-Kupffera/MPs i komórek śródbłonka naczyń zatokowych wątroby (LESCs) u dzieci z AIH

c/ Trzeci etap obejmował badania ultrastrukturalne populacji komórek macierzystych/owalnych wątroby (HPCs/oval cells) i otaczających je komórek gwiaździstych wątroby (HSCs) w modelu doświadczalnym wtórnego włóknienia żółciowego

Wszystkie diagnozowane dzieci hospitalizowane były w Klinice Pediatrii, Gastroenterologii, Hepatologii, Żywienia i Alergologii UMB (Kierownik Kliniki Pan Profesor dr hab. Maciej Kaczmarek; obecnie Pan Profesor dr hab. Dariusz Lebensztejn). W przypadkach podejrzenia NASH lub AIH, przed zakwalifikowaniem do leczenia, materiał tkankowy pobierany był drogą przezskórnej oligobiopsji wątroby. Natomiast materiał doświadczalny pozyskiwano z wycinków wątroby od młodych szczurów, u których operacyjne podwiązano przewód żółciowy wspólny (model włóknienia typu - BDL).

U wszystkich diagnozowanych pacjentów badania ultrastrukturalne były poprzedzone rutynową oceną histopatologiczną, poszerzoną o wybrane barwienia histochemiczne, wykonaną w Zakładzie Patomorfologii Lekarskiej UMB przez specjalistę patomorfologa, członka Krajowej Grupy Eksperckiej ds. Schorzeń Wątroby działającej w ramach Polskiego Towarzystwa Patologów.

Na powyższe badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej UMB i Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Białymstoku.

**Metodyka badań ultrastrukturalnych** przy użyciu mikroskopu elektronowego transmisyjnego (TEM) zawarta we wszystkich 5 publikacjach stanowiących osiągnięcie naukowe, zarówno w przypadku diagnozowanych pacjentów z NASH i AIH a także badań doświadczalnych z użyciem modelu BDL, była wspólna. Materiał tkankowy (błoczki tkankowe o objętości 1mm<sup>3</sup>) uzyskany od pacjentów drogą biopsji wątroby lub pobrany od zwierząt doświadczalnych i przeznaczony do badań ultrastrukturalnych, został utrwalony w mieszaninie płynu zawierającego roztwór 2 % paraformaldehydu i 2.5 % aldehydu glutarowego, w 0.1 M buforze kaskodylowym, o pH 7.4. i dotrwalony w roztworze czterotlenku osmu. Następnie w sposób rutynowy doprowadzony do zatopienia w Eponie 812 i skrawany na ultramikrotomie

(Reichert Ultracuts). Uzyskane skrawki półcienkie (grubości 0.5-1,5  $\mu\text{m}$ ) barwiono roztworem 1% błękitu metylenowego i oglądano w mikroskopie świetlnym. Z wybranych skrawków półcienkich zostały sporządzane skrawki ultracienkie, które podwójnie kontrastowano wodnym roztworem octanu uranylu i cytrynianem ołowiu. Materiał oglądano i fotografowano w mikroskopie elektronowym transmisyjnym Opton EM 900, wyposażonym w kamerę TRS (CCD camera for TEM 2k inside).

**Omówienie głównych wyników badań uzyskanych w każdym z trzech etapów pracy naukowej:**

### **1. Ocena ultrastrukturalna populacji hepatocytów i komórek B.-Kupffera/MPs u dzieci z NASH (publikacja nr 2 i nr 1)**

Niealkoholowa choroba stłuszczeniowa wątroby - NAFLD (*ang. nonalcoholic fatty liver disease*), a zwłaszcza jej zaawansowana forma, określana **niealkoholowym stłuszczeniowym zapaleniem wątroby – NASH** (*ang. nonalcoholic steatohepatitis*) stanowi obecnie duży problem zdrowotny, głównie dotyczący społeczeństw krajów wysokorozwiniętych (USA, Japonia, Włochy). W ostatniej dekadzie obserwuje się również i w naszym kraju wyraźne zwiększenie liczby pacjentów otyłych, zarówno dorosłych jak i dzieci, potencjalnie narażonych na tę patologię. Niektóre źródła podają, że NAFLD występuje nawet u 1/5 pacjentów, u których należna masa ciała została przekroczona o 40 %. Choroba ta obejmuje duży zakres nieprawidłowości wątroby – od prostego stłuszczenia hepatocytów po zmiany silnie wyrażone, o charakterze **NASH**. Uważa się, że do jej rozpoznania niezbędne jest badanie biopsyjne wątroby (*Brunt et al. 2009 (5)*).

Chociaż NAFLD stanowi częstą patologię tego narządu, jednakże jak dotychczas, jej morfogeneza, a zwłaszcza NASH, jest wyjątkowo słabo poznana. Ostatnia dekada miała być pod tym względem przełomowa, ale niestety, nowe badania odkrywcze nad wiarygodnymi, morfologicznymi wykładnikami charakterystycznymi dla tej choroby są bardzo skąpe.

#### **A/ Analiza ultrastrukturalna hepatocytów u dzieci z NASH (publikacja nr 2)**

Podjęte przeze mnie badania mikroskopowo-elektronowe **hepatocytów** w NASH u dzieci ujawniły nową, morfologiczną cechę charakterystyczną dla tej patologii u pacjentów wieku rozwojowego. Inspiracją do badań były doniesienia biochemiczne wskazujące, że w przebiegu

NASH dochodzi na poziomie hepatocytu do zwiększenia produkcji kwasów tłuszczowych, co wywołuje zaburzenia równowagi oksydo-redukcyjnej i stres oksydacyjny oraz poważną dysfunkcję mitochondriów (*Basarangulu et al. 2013*) (6). Do podjęcia tych badań zachęciły mnie także wcześniejsze obserwacje submikroskopowe nad mitochondriami komórek mięsnych wątroby w NASH u pacjentów dorosłych prowadzone przez badaczy amerykańskich (*Caldwell et al. 2009*) (7).

Badania ultrastrukturalne przeprowadziłam na materiale retrospektywnym obejmującym histopatologicznie zdiagnozowane przypadki NASH u dzieci, u których wcześniej wykluczono: choroby infekcyjne (zakażenia: HBV, HCV, CMV, *Toxoplasma gondii*), schorzenia na podłożu autoimmunizacyjnym, wybrane choroby metaboliczne wątroby, toksyczne działania leków i chorobę trzewną.

Dokonana ocena ujawniła w 9 na 10 przypadków badanej patologii, w obrębie hepatocytów, niejednokrotnie w pobliżu materiału lipidowego, interesujące, powtarzające się **nieprawidłowości mitochondrialne**. Na plan pierwszy wysuwał się polimorfizm tych organelli, z obecnością nierównomiernie rozmieszczonych w cytoplazmie komórki **megamitochondriów (MMC)**, wykazujących znaczne ubytki grzebieni i wyraźne zwiększenie gęstości elektronowej macierzy. Cechą charakterystyczną obrazu ultrastrukturalnego MMC, było występowanie na terenie ciemnej macierzy wewnątrzmitochondrialnych liniowych, o średnicy 10 nm, **wtrętów krystalicznych** (ang. *intramitochondrial linear crystalline inclusions*). Struktury te miały obraz równoległe ułożonych pęczków deformujących kształt organelli. Średnica liniowych inkluzji wynosiła 10 nm a odległość pomiędzy nimi 20 nm. Niekiedy towarzyszyły im powiększone i w zwiększonej liczbie gęste ziarnistości wewnątrzmitochondrialne. Dodatkowo, oprócz nieprawidłowości mitochondrialnych, obserwowałam na terenie cytoplazmy hepatocytów różnie wyrażone zmiany, głównie proliferację pęcherzykową gładkiej sieci śródplazmatycznej i nadmierne gromadzenie glikogenu w pobliżu jądra komórkowego.

Okołonaczyniowa przestrzeń Dissego dość często zawierała pobudzone przejściowe komórki gwiazdziste wątroby (T-HSCs), którym towarzyszył proces **fibrogenyzy** - najpierw zwiększone gromadzenie się bezpostaciowego materiału elektronowo gęstego a następnie pęczków dojrzałych włókien kolagenowych.

### **Podsumowanie wyników badań:**

1. Jest to pierwsza w literaturze wyczerpująca praca analizująca morfologię poszczególnych elementów strukturalnych hepatocytu u dzieci z NASH.

2. Najbardziej nasilone i powtarzające się zmiany mikroskopowo-elektronowe charakterystyczne dla tej patologii wyrażały się obecnością **megamitochondriów** chaotycznie rozrzuconych na terenie cytoplazmy hepatocytów. **MMC** zawierały charakterystyczne **linijne wtręty** (ang. *linear crystalline inclusions*) jawiące się w postaci równolegle ułożonych struktur; wykazywały również wyraźne ubytki grzebieni, po ich całkowity brak.
3. Zmiany submikroskopowe obserwowane w obrębie hepatocytów, zwłaszcza nieprawidłowości mitochondrialne, mogą odgrywać kluczową rolę w morfogenezie NASH u pacjentów pediatrycznych. Możliwe, że pojawiające się na terenie hepatocyta MMC zawierające linijne inkluzje, są morfologicznym wykładnikiem **procesu adaptacyjnego komórki** na stres oksydacyjny w przebiegu choroby.
4. Mikroskopia elektronowa transmisyjna stanowi bardzo użyteczne, efektywne narzędzie badawcze w diagnostyce ultrastrukturalnej biopsji wątroby u dzieci z NASH, które powinno być stosowane przynajmniej w trudnych diagnostycznie przypadkach tej patologii. Tego typu badania mogą mieć nie tylko implikacje diagnostyczne ale i terapeutyczne.

#### **B/ Ocena ultrastrukturalna komórek B.-Kupffera/MPs u dzieci z NASH (publikacja nr 1)**

W ostatniej dekadzie, zwłaszcza w latach 2005 – 2010, pojawiły się w literaturze hepatopatologicznej, głównie z ośrodków japońskich, interesujące doniesienia przedstawiające kolejne hipotezy, które również wydają się być istotne w morfogenezie NASH. Autorzy koncentrowali się na domniemanej roli **komórek B.-Kupffera/MPs (KCs/MPs)** naczyń zatokowych wątroby w generowaniu stresu oksydacyjnego w przebiegu choroby w warunkach doświadczalnych i u pacjentów dorosłych z NASH (*Otogawa et al. 2007; Kawada et al. 2007*) (8, 9). Mając powyższe na uwadze **zasadniczym celem** mojej pracy była ocena morfologiczna komórek nieparenchymalnych wątroby, ze szczególnym uwzględnieniem ultrastruktury komórek **(KCs/MPs)**, w materiale biopsyjnym wątroby od dzieci z wcześniej morfologicznie zdiagnozowanym NASH. Jest to tym bardziej interesujące, że brak jest w literaturze podobnych opracowań u **pacjentów pediatrycznych**. Poszerzyliśmy także nasze obserwacje o analizę

immunoreaktywności KCs/MPs, co mogło korespondować ze stopniem nasilenia pobudzenia tych komórek w przebiegu schorzenia.

Badania dotyczyły tych samych pacjentów pediatrycznych, u których w przebiegu NASH oceniałam ultrastrukturę hepatocytów (**publikacja nr 2**).

Przeprowadzona ocena **KCs/MPs** na poziomie mikroskopii elektronowej a także równoległe wykonane barwienia IHC w kierunku białka CD68 wykazały na terenie zrazika wątrobowego u dzieci z NASH wyraźne zwiększenie liczby tej populacji komórkowej oraz jej nadmierną aktywność. Obserwowałam znacznie pobudzone i powiększone KCs, które wypełniały dużą część światła naczyń zatokowych, prowadząc do ich zamknięcia, co stanowiło cechę charakterystyczną obserwowanych zmian mikroskopowych, Pobudzeniu KCs/MPs towarzyszyło wyraźne obrzmienie wyściółki śródbłonkowej wyściełającej naczynia zatokowe wątroby. Wyróżniającą, często obserwowaną cechą wskazującą na nadmierne pobudzenie KCs/MPs było **zjawisko erytrofagocytozy** manifestujące się występowaniem w obrębie cytoplazmy obfitującej w pleomorficzne lizosomy, luźno leżących i różnej wielkości pochłoniętych fragmentów **erytrocytów**. Zwracały również uwagę towarzyszące zmiany mitochondrialne (od obrzmienia, po znaczne zwyrodnienie wyrażające się dużą utratą grzebieni, z pojawianiem się struktur mielinowych) i nadmiernie rozbudowana strefa aparatu Golgiego. Niejednokrotnie do nadmiernie pobudzonych **KCs/MPs** bezpośrednio przylegały inne nieparenchymalne komórki wątroby (**NPCs**) – tj. przejściowe komórki gwiazdziste wątroby (**T-HSCs**), jak również komórki macierzyste/owalne wątroby (**HPCs/oval cells**). Spotykane tam **T-HSCs** charakteryzowały się wydłużonym kształtem i zmniejszoną zawartością na terenie cytoplazmy materiału lipidowego. Posiadały wyraźnie poszerzone kanały sieci śródplazmatycznej ziarnistej i zwiększoną ilość elementów cytoszkieletu. Natomiast komórki populacji **HPCs/oval cells** głównie wykazywały charakter nisko zróżnicowanych komórek macierzystych lub różnicowały się w kierunku **linii hepatocelularnej**, tj. do tzw. pośrednich, przypominających hepatocyty, form komórkowych (ang. *intermediate hepatocyte-like cells*). Badaniom ultrastrukturalnym poszczególnych typów komórek macierzystych wątroby w NASH u dzieci, zwłaszcza postaci różnicującej się w kierunku hepatocyta, poświęcona była nasza publikacja, która ukazała się drukiem przed złożeniem pracy doktorskiej (*Sobaniec-Łotowska et al. 2011*) (10).

Często w pobliżu pobudzonych KCs/MPs obserwowałam cechy **fibrogenyzy**. Włókna kolagenowe niejednokrotnie oplatały zarówno KCs/MPs, jak i T-HSCs i HPCs/oval cells, będąc z nimi, zwłaszcza z T-HSCs, w bezpośrednim kontakcie.

Uzyskane wyniki badań ultrastrukturalnych populacji KCs/MPs korespondują z obserwacjami prezentowanymi przez innych autorów w różnych modelach doświadczalnych

NASH i u pacjentów dorosłych z tą patologią (*Otagawa et al. 2007; Farrell et al. 2008; Kiki et al. 2008*) (8, 11, 12). Przypuszczam, że obciążone erytrocytami KCs/MPs, podobnie jak w modelu doświadczalnym z NASH (*Otagawa et al. (2007) (9)*), mogą prowadzić do odkładania na terenie wątroby żelaza pochodzącego z hemoglobiny, co promuje stres oksydacyjny, stan zapalny i włóknienie narządu.

**Praca na temat analizy ultrastrukturalnej populacji KCs/MPs u dzieci z NASH zakończona jest następującymi wnioskami:**

1. Przeprowadzone badania ultrastrukturalne, pierwsze w literaturze hepatologicznej, wyraźnie wskazują, że populacja KCs/MPs wątroby, zwłaszcza wykazujących cechy **erytrofagocytozy**, może być wyraźnie włączona w morfogenezę i rozwój NASH u dzieci.
2. Należy przypuszczać, że nadmiernie pobudzone i kumulujące żelazo pochodzące z hemoglobiny KCs/PMs mogą odgrywać istotną rolę w uruchomieniu stresu oksydacyjnego w przebiegu choroby.
3. Ponadto interesujące, jednakże wymagające dalszych pogłębionych badań, jest wzajemne oddziaływanie pomiędzy nadmiernie pobudzonymi KCs/PMs a przylegającymi przejściowymi komórkami gwiazdzistymi (T-HSCs) i komórkami macierzystymi/owalnymi wątroby (HPCs/oval cells) oraz towarzyszący tej interakcji proces fibrogenyzy u dzieci z ASH.

Uzyskanie odpowiedzi na temat udziału komórek B.-KCs/MPs w morfogenezie NASH u dzieci ważne jest nie tylko ze względów poznawczych ale także z uwagi na ewentualne poszerzenie badań w kierunku poszukiwania terapii antyoksydacyjnych.

## **2. Ocena ultrastrukturalna populacji komórek B.-Kupffera/MPs i komórek śródbłónka naczyń zatokowych wątroby (LESCs) u dzieci z AIH (publikacja nr 3 i nr 5)**

Dalszym etapem mojej pracy są badania morfologiczno-kliniczne, głównie przy użyciu TEM nad morfogenezą i rozwojem **autoimmunizacyjnego zapalenia wątroby (AIH)**, przewlekłej, o słabo poznanej etiopatogenezie, chorobie autodestrukcyjnej wątroby, występującej zarówno u dorosłych jak i u dzieci, wykazującej, zwłaszcza w ostatnim dziesięcioleciu wyraźną tendencję wzrostową zachorowania. Patologia ta niejednokrotnie współistnieje, zwłaszcza u pacjentów pediatrycznych, z intensywnym włóknieniem/marskością wątroby (*de Boer et al. 2015; Radhakrishnan et al. 2010; Soares et al. 2016*) (13, 14, 15). Cechuje ją wysoka aktywność

aminotransferaz w surowicy krwi, wzrost stężenia immunoglobuliny G (IgG) w surowicy krwi i obecność krążących autooprzeciwciał. Zdecydowanie częściej występuje u pacjentów płci żeńskiej i charakteryzuje się dobrą odpowiedzią na leczenie immunosupresyjne. Choroba ma różny przebieg kliniczny, od łagodnego po bardzo poważny, kończący się niewydolnością narządu i zejściem śmiertelnym, przeważnie z powodu masywnej martwicy hepatocytów lub marskości (de Boer et al. 2015; Gossard, Lindor 2012; Mieli-Vergani et al. 2018) (13, 16, 17).

Obraz histopatologiczny AIH jest stosunkowo mało specyficzny. Na plan pierwszy wysuwa się zapalenie wątroby o charakterze "interface" i zrazikowego, od średnio wyrażonego po stopnia dużego, z odczynem martwiczo-zapalnym obfitującym w komórki plazmocytarne i limfocyty w przestrzeniach bramnych, z pojawianiem się hepatocytów tworzących rozetki. Stan zapalny w tej patologii ściśle związany jest z procesem fibrogenezy i progresją włóknienia. W miejscu tym należy dodać, że wg ścisłych arbitralnych zaleceń IAHG, tj. Międzynarodowej Grupy do badań nad Chorobą Autoimmunologiczną Wątroby (*The International Autoimmune Hepatic Group*) ocena mikroskopowa biopsji wątroby, jako integralna część rozpoznania, stanowi, przed wdrożeniem terapii immunosupresyjnej, konieczny warunek końcowej diagnozy AIH (Mieli-Vergani et al. 2018) (17).

#### **A/ Analiza ultrastrukturalna populacji komórek B.-Kupffera/MPs w AIH u dzieci** **(publikacja nr 3)**

W naszym Ośrodku opracowałam metodę wczesnej **diagnostyki ultrastrukturalnej AIH** u pacjentów pediatrycznych i wprowadziłam tę metodę do praktyki badań morfologicznych nad wspomnianą patologią.

Obserwacje nad AIH dotyczyły 14 nie leczonych dzieci (3 chłopców i 11 dziewczynek w wieku 5-17 lat), u których w badaniach laboratoryjnych stwierdzono wysoką aktywność aminotransferaz w surowicy krwi – alaninowej i asparaginianowej oraz poważne zaburzenia immunologiczne i serologiczne – podwyższone stężenie IgG, obecność autooprzeciwciał p-jądrowych (ANA) i/lub przeciwciał skierowanych przeciwko mięśniom gładkim (SMA) i LKM. Przed wykonaniem biopsji wątroby u wszystkich dzieci wykluczono choroby zakaźne wątroby (zakażenie HBV, HCV, CMV, *Toxoplasma gondii*), niektóre zaburzenia metaboliczne (choroba Wilsona, mukowiscydoza, niedobór alfa-1 antytrypsyny/antyproteazy) i chorobę trzewną.

W badaniach mikroskopowo-elektronowych, w przeszło 70% przypadków, z uprzednio histopatologiczno-klinicznie rozpoznanym AIH (u 9/14 pacjentów), stwierdziłam na terenie cytoplazmy znacznie pobudzonych **KCs/MPs** obecność bardzo charakterystycznych, dotychczas

nie opisywanych, zmian o obrazie **szklistych wtrętów kropelkowych** (ang. *glassy droplet inclusions* – **GDI**). Inkluzje te obserwowałam w obrębie **KCs/MPs** zatok wątrobowych a także w makrofagach położonych poza lokalizacją zatokową. Były okrągłe, bardzo dobrze odgraniczone od otoczenia, wypełnione homogeną treścią o średniej gęstości elektronowej i zawierały wyraźne, przeważnie centralnie położone, przeziernie pole. Często w pobliżu GDI spotykałam znacznie uszkodzone mitochondria cechujące się dużym obrzmieniem i wybitną utratą grzebieni mitochondrialnych.

Powyższe nieprawidłowości dotyczące populacji B.-KCs/MPs współistniały u tych samych pacjentów z wyraźnym uszkodzeniem **wyściółki śródbłonkowej** zatok (**publikacja nr 5**) a także z pojawieniem się na terenie zrazika wątrobowego populacji **komórek plazmatycznych** zawierających **ciałka Russela**. Niezwykle interesujące jest, że obraz mikroskopowo-elektronowy analizowanych GDI był identyczny z ultrastrukturą ciałek Russela jednocześnie występujących na terenie cytoplazmy komórek plazmatycznych (wykładnik morfologiczny zwyrodnienia kropelkowo-szklistego komórki), co może wskazywać na udział populacji komórek plazmatycznej w ich powstawaniu.

Mam podstawy przypuszczać, że analizowane charakterystyczne wtręty śródplazmatyczne zawierają depozyty **immunoglobulin G**, co koreluje z wynikami badań laboratoryjnych. Otóż u wszystkich pacjentów pediatrycznych z AIH, u których przy użyciu TEM wykryłam na terenie cytoplazmy KCs/MPs obecność szklistych kropelkowych inkluzji (**9/14** pacjentów – 71,4%), aktywność surowiczej IgG był co najmniej 2 x powyżej normy laboratoryjnej. Natomiast u dzieci z AIH, u których nie znalazłam takich struktur stężenie IgG nie przekraczało 1.5 x górnej granicy normy.

Warto także odnotować, że w pobliżu pobudzonych KCs/MPs dość często obserwowałam cechy **fibrogeny** i rozwoju włóknienia, co manifestowało się obecnością w okołonaczyniowej przestrzeni Dissego wiązek włókien kolagenowych..

**Podsumowując wyniki badań wyciągnięto następujące wnioski:**

1. Wykrycie na poziomie ultrastruktury, dotychczas nie opisywanych w autoimmunizacyjnych chorobach wątroby, charakterystycznych **śródplazmatycznych szklistych wtrętów** w **KCs/MPs**, identycznych z ciałkami Russel'a komórek plazmatycznych, stanowi nową, użyteczną, patognomiczną cechę w diagnostyce ultrastrukturalnej AIH u dzieci. Może także być pomocne w diagnostyce różnicowej AIH z innymi przewlekłymi chorobami zapalnymi wątroby.



2. Uzyskane wyniki są punktem odniesienia i stanowią interesujący materiał porównawczy dla podobnych badań submikroskopowych nad tą patologią prowadzonych przez inne Ośrodki.

W miejscu tym pragnę dodać, że omawiana praca zawiera bardzo demonstracyjny i ciekawy zestaw elektronogramów obrazujący ultrastrukturę GDI. Powyższe wyniki zostały ogłoszone drukiem w wiodącym czasopiśmie gastroenterologicznym i hepatologicznym *Digestive and Liver Disease*.

### **B/ Ocena ultrastrukturalna komórek śródbłonka naczyń zatokowych wątroby (LSECs) u dzieci z AIH (publikacja nr 5)**

W kolejnej pracy na temat morfogenezy i rozwoju AIH u dzieci zwróciłam szczególną uwagę na obraz ultrastrukturalny komórek śródbłonka naczyń zatokowych wątroby (ang. *liver sinusoidal endothelial cells* - LSECs) i ich rolę w progresji schorzenia.

Obserwacje przeprowadziłam na większej, tj. dodatkowo o 3 kolejne zachorowania, grupie chorych z AIH (łącznie 17 dzieci, w tym 14 dziewczynek).

W obecnych badaniach, również po raz pierwszy w literaturze, opisałam różnie wyrażone zmiany submikroskopowe w LSECs, od obrzmienia poprzez tzw. **ciągły typ śródbłonka** (ang. *continuous type of endothelium*) po obumieranie wyściółki śródbłonkowej, co wskazuje na istotny udział tych komórek, łącznie z uszkodzeniem innych NPCs, w powstawaniu i rozwoju AIH u dzieci. Często uszkodzenie komórek śródbłonka zatok współistniało z wyżej opisanymi, charakterystycznymi zmianami mikroskopowo-elektronowymi w obrębie KCs/MP (**publikacja nr 3**) a także z procesem fibrogenezy i rozwojem włóknienia w okołonacyniowych przestrzeniach Dissego. Procesowi fibrogenezy towarzyszyło pojawianie się opisywanych powyżej subpopulacji pobudzonych, o właściwościach fibrokompetentnych, przejściowych komórek gwiaździstych wątroby (ang. *transitional form of hepatic stellate cells* – T-HSCs), odpowiedzialnych za syntezę białek macierzy pozakomórkowej i pełniących kluczową rolę w powstawaniu włókien kolagenowych. Do komórek tych przylegała zagęszczona substancja drobnowłóknikowa, mogąca odpowiadać substancji prekolagenowej a także pęczki dojrzałych włókien kolagenowych.

Warto odnotować, że chociaż w połowie analizowanych przypadków AIH obserwowałam zjawisko przekształcania się prawidłowej, tj. nieciągłej - posiadającej charakterystyczne fenestracje - wyściółki śródbłonkowej zatok wątrobowych w ciągłą, tj. pozbawioną mikrootworów typ śródbłonka, to nie stwierdziłam w tak zmienionych sinusoidach, pod warstwą

wyściółki śródbłonkowej, tworzenia prawdziwej błony podstawnej. Tak więc nie zaobserwowałam zjawiska kapilaryzacji zatok wątrobowych charakterystycznego dla rozwijającej się marskości wątroby, co **sugeruje**, że przypadki badanej patologii były diagnozowane na **stosunkowo wczesnym etapie** rozwoju choroby.

**Na podstawie przeprowadzonych badań wyciągnięto następujące wnioski:**

1. Poważne zmiany w LSECs (tzw. **ciągły typ śródbłonka** a także jego obumieranie) współistniejące z uszkodzeniem innych NPCs wskazują, że populacja komórek śródbłonka w sposób istotny włączone jest w morfogenezę AIH u pacjentów pediatrycznych.
2. Można sądzić, że nie wytworzenie prawdziwej błony podstawnej, nawet jeśli LSECs były znacznie uszkodzone, wskazuje na zachowane jeszcze właściwości regeneracyjne tych komórek i możliwość cofnięcia się zaistniałych zmian (*restitutio ad integrum*). To sugeruje realną możliwość odtworzenia prawidłowej wyściółki śródbłonkowej, co może mieć istotne znaczenie dla efektywnej terapii AIH u dzieci i powinno skutkować normalizacją ultrastruktury LSECs.
3. **Analiza mikroskopowo-elektronowa populacji komórek macierzystych/owalnych wątroby (HPCs/oval cells) i otaczających je komórek gwiaździstych wątroby (HSCs) w modelu doświadczalnym włóknienia żółciowego - model BDL) ( publikacja nr 4)**

Od lat podkreśla się, że proces **fibrogenyzy** i rozwoju włóknienia/marskości wątroby jest niezwykle złożony i pomimo intensywnych badań doświadczalnych i klinicznych, jak dotychczas nie został wystarczająco poznany. Proces ten charakteryzuje się nadmiernym gromadzeniem białkowych składników macierzy pozakomórkowej (ang. *extracellular matrix* - ECM), co jest wynikiem zaburzeń dynamicznej równowagi pomiędzy syntezą (fibrogeneza) a ich degradacją (fibroliza). W przebiegu włóknienia deponowane są nadmierne ilości składników ECM w okołonaczyniowych przestrzeniach Dissego, które inicjują rozwój fibrogenyzy i stanowią najwcześniejszą morfologiczną postać tej patologii (*Friedman 2008; Schuppan 2015*) ( 18, 19).

**Stopień skomplikowania** zjawiska włóknienia/marskości wątroby nie pozwala na zastąpienie modelu zwierzęcego metodami alternatywnymi. W literaturze hepatologicznej eksponuje się **dwie klasyczne metody eksperymentalnej fibrogenyzy – model operacyjny**, wywołany zamknięciem poprzez ligaturowanie przewodu żółciowego wspólnego (ang. *Bile Duct Ligation Model* - BDL model) i **model farmakologiczny** wywołany przewlekłym stosowaniem selektywnej hepatotoksyny.

Przyjmuje się, że największy udział w procesie **fibrogenezy** mają aktywne metabolicznie tzw. **przejściowe**, określane **fibrokompetentnymi, komórki gwiaździste wątroby** (ang. *transitional HSCs - T-HSCs*) i komórki o fenotypie miofibroblastów wchodzące w skład tzw. nieparenchymalnych komórek wątroby (**NPCs**) (*Friedman 2008*) (18). Biorąc pod uwagę rolę, jaką HSCs odgrywają w procesie fibrogenezy, nazwane zostały „mistrzem produkcji włóknienia”. Ostatnio jednak donosi się, że oprócz przejściowych HSCs, bardzo istotne, przynajmniej równorzędne z HSCs, a wg niektórych nawet większe znaczenie w morfogenezie fibroplazji kolagenowej wątroby odgrywa populacja nisko zróżnicowanych, **multipotencjalnych komórek macierzystych wątroby** (ang. *hepatic progenitor /oval cells - HPCs/oval cells*), a zwłaszcza subpopulacja komórek o charakterze pobudzonych cholangiocytołów (ang. *activated cholangiocytes*) (*Schuppan 2015; Clouston et al. 2005*) (19, 20). Jak wspomniałam we *Wprowadzeniu* populacja niskozróżnicowanych multipotencjalnych HPCs/oval cells stanowi znikomy odsetek wszystkich komórek narządu (około 1-3%). Ze względu na ich kształt nazywane są komórkami owalnymi wątroby. HPCs/oval cells wykazują szereg cech wspólnych, zarówno strukturalnych, jak i funkcjonalnych, z hepatoblastami okresu zarodkowego i płodowego. Obecnie przyjmuje się, że są to komórki o właściwościach bipotencjalnych i traktuje jako komórki prekursorowe dla hepatocytów lub cholangiocytołów. Komórek tych, ze względu na bardzo małe rozmiary, **nie można wykryć** w rutynowych badaniach histologicznych. **Najbardziej wiarygodna identyfikacja** jest na poziomie **mikroskopii elektronowej transmisyjnej**; w dużo mniejszym stopniu przy użyciu badań IHC (*Guettier 2005; Yovchev et al. 2008; He, Feng 2011*) (2, 3 4). Przyjmuje się, że namnażanie komórek owalnych, ich stopniową wędrówkę w narządzie i różnicowanie w kierunku hepatocytów lub cholangiocytołów „kontrolują” pobudzone komórki nieparenchymalne, zwłaszcza przejściowe komórki gwiaździste (**T-HSCs**), substancja międzykomórkowa i szereg czynników wzrostowych.

Mając powyższe na uwadze oraz ze względu na nieliczne prace z zakresu identyfikacji morfologicznej poszczególnych subpopulacji komórek owalnych wątroby, **celem trzeciego etapu** moich badań była charakterystyka ultrastrukturalna **HPCs/oval cells**, zwłaszcza przedziału komórkowego o charakterze pobudzonych cholangiocytołów, w procesie fibrogenezy i rozwoju włóknienia wątroby w warunkach eksperymentalnej cholestazy. Przeanalizowałam również, na poziomie mikroskopii elektronowej transmisyjnej, obraz **interakcji komórkowych** zachodzących pomiędzy komórkami owalnymi a obecnymi w ich bliskim sąsiedztwie pobudzonymi HSCs i KCs/MPs.

Ten typ włóknienia narządu uzyskano u młodych szczurów poprzez operacyjne podwiązanie przewodu żółciowego wspólnego (**model włóknienia typu BDL**). Jest to model

fibroplazji kolagenowej wątroby w pełni skuteczny, powtarzalny i akceptowany w literaturze hepatologicznej. W Polsce po raz pierwszy zastosowany został w naszym Ośrodku.

Badania przeprowadzono na 6 tygodniowych szczurach rasy Wistar Cr1 (Han), u których stosując przez 1, 6 i 8 tygodni, w znieczuleniu ogólnym, operacyjne podwiązanie przewodu żółciowego wspólnego (po 10 zwierząt w każdej grupie badanej) wywoływano wtórne włóknienie żółciowe o charakterze postępującej **reakcji fibroduktularnej**. **Grupę porównawczą** stanowiły zwierzęta poddane procedurom anestezyjologicznym. Metodyka badań przy użyciu TEM opisana we *Wprowadzeniu*.

W procesie fibrogenyzy i rozwoju intensywnego włóknienia żółciowego u młodych szczurów stwierdziłam wyraźną proliferację populacji HPCs/oval cells, wśród których wyróżniłam **cztery główne typy komórek owalnych**: komórki **typu 0** (ang. **“type 0 cells”**); **komórki typu I** - tj. niezróżnicowane HPCs (ang. **“type I cells”**, syn. *undifferentiated HPCs*) a także komórki różnicujące się w kierunku cholangiocytów i hepatocytów - **tj. komórki typu II** (ang. **“type II cells”**, syn. *the bile duct-like cells*) i **typu III** (ang. **“type III cells”**, syn. *the hepatocyte-like cells*). Najczęściej spotykałam **typ II komórek**, tj. HPCs różnicujące się w kierunku nabłonka dróg żółciowych.

W pracy dokonałam **dokładnej charakterystyki ultrastrukturalnej poszczególnych typów populacji HPCs/oval cells**, począwszy od typu 0 do typu III włącznie. Wg mnie bardzo interesującą subpopulacją analizowanych komórek owalnych były **komórki typu I** (syn. *undifferentiated HPCs*), odpowiadające komórkom podstawnym (*“basal cells”*), o obrazie bardzo prymitywnych komórek. Położone były głównie wewnątrz proliferujących przewodników żółciowych, chociaż obserwowałam je także na terenie przegród włóknistych i na obrzeżu guzków regeneracyjnych. Charakteryzowały się bardzo małymi rozmiarami (od 3,0 do 5,0  $\mu\text{m}$ ), owalnym lub okrągłym kształtem, dużym, owalnym, elektronowo gęstym jądrem komórkowym, skąpą ilością cytoplazmy, co wyrażało się wysokim stosunkiem jądra komórkowego do cytoplazmy (*a high nucleus/cytoplasm ratio*). Zawierały minimalnie zróżnicowanymi struktury śródkomórkowe. Ich błona komórkowa tworzyła ścisłe połączenia (lub tzw. desmosomalno-podobne połączenia) z otaczającymi komórkami.

**Fundamentalnym**, dotychczas nie wyjaśnionym wystarczająco problemem pozostaje odpowiedź na pytanie o obecność, lub jej brak, w pobliżu HPCs w przebiegu włóknienia narządu innych populacji komórek wątroby, zwłaszcza **NPCs**. Otóż we wszystkich grupach badanych w **procesie fibrogenyzy** i rozwoju włóknienia często obserwowałam w bliskiej obecności HPCs pojawianie się subpopulacji przejściowych komórek gwiazdzistych (**T-HSCs**) i pobudzonych **komórek B.- Kupffera/makrofagów**. Znajdowałam je w tkance łącznej kolagenowej oplatającej

nowopowstałe przewodniki żółciowe a także na terenie przegród włóknistych i w ogniskach zwłóknień, gdzie niejednokrotnie przylegały do komórek owalnych.

Zastosowanie TEM pozwoliło dokładnie prześledzić obraz ultrastrukturalny **bezpośredniego przylegania komórkowego (*direct cell-cell contact*)** za pośrednictwem ścisłych połączeń komórkowych (*intercellular tight junctions or desmosome-like junctions*) pomiędzy poszczególnymi **typami HPCs** a sąsiadującymi **komórkami NPCs**, zwłaszcza subpopulacją T-HSCs i pobudzonymi komórkami B.- Kupffera/makrofagami.

Subpopulacja przejściowych, **fibrokompetentnych T-HSC** charakteryzowała się, w porównaniu do tzw. spoczynkowych HSCs (ang *quiescent hepatic stellate cells* - Q-HSCs) zdecydowanie wydłużonym kształtem, dużą utratą, do prawie całkowitej, cytoplazmatycznego materiału lipidowego; zawierała rozbudowane i wybitnie poszerzone kanały sieci śródplazmatycznej ziarnistej i pobudzoną strefę aparatu Golgiego. W miejscu tym warto dodać, że populacja komórek gwiazdzistych wątroby, ze względu na ich obraz morfologiczny, biologię i rozliczne funkcje, jakie pełnią na terenie narządu, od lat określane są w literaturze jako jedne z **najbardziej fascynujących** a jednocześnie **enigmatycznych** komórek organizmu (*Friedman 2008*) (18), czego odzwierciedleniem są liczne nazwy synonimowe odnoszące się do tej populacji komórkowej.

Pragnę zwrócić uwagę na zamieszczone w pracy unikalne elektronogramy, które m. innymi przedstawiają wybitnie rzadko demonstrowany w literaturze, **fenomen penetracji błony podstawnej** nowo powstałych, proliferujących przewodników żółciowych (*proliferating bile ductules*) przez wypustki przejściowych komórek gwiazdzistych (**T-HSCs**) i tworzenie bezpośredniego kontaktu (*direct cell-cell contact*) z komórką macierzystą o charakterze *ductular epithelial cell*, tj. różnicującą się w kierunku nabłonka przewodników żółciowych. Według mnie zjawisko to może dowodzić równorzędnego udziału obu populacji komórek wątroby, tj. HPCs/oval cells i HSCs w morfogenezie i rozwoju wtórnego włóknienia żółciowego. Możliwe, że dochodzi do tego poprzez wysyłane ze strony komórek owalnych na drodze *direct cell-cell contact* do przylegających komórek gwiazdzistych specyficzne sygnały, co promuje proces fibrogenyzy. Potwierdzenie powyższej hipotezy wymaga jednak dalszych badań.

**Przeprowadzone badania ultrastrukturalne populacji HPCs/oval cells w doświadczalnym żółciowym włóknieniu wątroby pozwalają stwierdzić:**

1. W przebiegu intensywnego włóknienia żółciowego typu BDL dochodzi do wyraźnej proliferacji HPCs/oval cells, co wskazuje na istotny udział tej populacji komórkowej w procesie fibrogenyzy. Wyróżniono **4 główne typy komórek**

**owalnych:** komórki **typu 0**; komórki **typu I** - tj. odpowiadające tzw. „**basal cells**” (ang. *undifferentiated HPCs*) oraz komórki różnicujące się w kierunku linii nabłonka dróg żółciowych i hepatocytów - tj. komórki **typu II** (ang. *the bile duct-like cells*) i **typu III** (ang. *the hepatocyte-like cells*). Najczęściej obserwowano **HPCs/oval cells** różnicujące się w kierunku **cholangiocytów**.

2. Wykazano silną dodatnią korelację pomiędzy intensywnością włóknienia wątroby a proliferacją badanych HPCs/oval cells, co w stosunku do rozrastających się przewodników żółciowych, wyrażało się **tzw. postępującą reakcją fibroduktularną** (ang. *progressive fibroductular reaction*). HPCs/oval cells, zwłaszcza subpopulacja typu II (ang. *the bile duct-like cells*) a także poprzedzająca je, bardzo prymitywna linia komórkowa o charakterze komórek typu I, mogą odgrywać kluczową rolę w morfogenezie reakcji fibroduktularnej towarzyszącej intensywnemu włóknieniu narządu.
3. W przebiegu doświadczalnej fibrogenyzy i rozwoju włóknienia wątroby należy podkreślić istotne znaczenie **wzajemnych interakcji komórkowych**, zwłaszcza bezpośredniego oddziaływania zachodzącego na drodze *direct cell-cell contact* pomiędzy populacją HPCs/oval cells a T-HSCs i pobudzonymi KCs/MPs.
4. Przedstawiony w obecnej pracy, wybitnie rzadko demonstrowany w literaturze światowej, **fenomen penetracji błony podstawnej** proliferujących przewodników żółciowych przez wypustki przejściowych komórek gwiaździstych (T-HSCs) i tworzenie bezpośredniego kontaktu (*direct cell-cell contact*) z komórką macierzystą o charakterze *ductular epithelial cell*, może wskazywać na równorzędny, bardzo ważny, udział obu populacji komórek wątroby, tj HPCs i HSCs w morfogenezie włóknienia żółciowego.
5. Badania submikroskopowe nad udziałem populacji HPCs/oval cells w morfogenezie eksperymentalnego włóknienia żółciowego typu BDL mają nie tylko wartość poznawczą; mogą również przyczynić się do poszukiwania i opracowania nowych efektywnych terapii antyfibrotycznych u pacjentów z przewlekłymi chorobami wątroby.

Pragnę dodać, że od niedawna badania doświadczalne nad progresywnym włóknieniem wątroby typu BDL poszerzyłam o tzw. farmakologiczny model włóknienia (w Polsce dotychczas nie stosowany) wywołany długotrwałym podawaniem młodym szczurom i. p. selektywnej hepatotoksyny - **tioacetamidu** (ang. *Thioacetamide model of fibrosis; TAA model*). Należy podkreślić, że analogiczny do modelu TAA panlobularny wzór włóknienia stwierdza się w większości chorób przewlekłych wątroby u ludzi (wyniki badań morfologicznych prezentowałam na Falk Symposium 211, *XXV International Bile Acid Meeting: Bile Acids in Health and Diseases*. Dublin – Ireland; July 6-7, 2018).

## Podsumowanie osiągnięcia naukowego

Przedstawione, jako osiągnięcie naukowe, publikacje uzupełniają wiedzę na temat roli badanych populacji komórek wątroby w morfogenezie NASH i AIH u dzieci oraz sekwencji zjawisk submikroskopowych zachodzących w komórce w przebiegu tych schorzeń, wnosząc ważne aspekty praktyczne. Pragnę podkreślić, że przeprowadzona analiza na poziomie mikroskopii elektronowej transmisyjnej (TEM) materiału oligobiopsyjnego wątroby ujawniła **duży potencjał diagnostyczny** ocenianych populacji komórkowych.

W przypadku **NASH** i **AIH**, wykonane badania ultrastrukturalne, pierwsze w hepatopatologii u pacjentów pediatrycznych, pozwoliły w zdecydowanej większości przypadków wykryć w obrębie ocenianych populacji komórkowych (populacji hepatocytów i KCs/MP w NASH oraz populacji KCs/MP i komórek śródbłonka zatok wątrobowych – LSECs - w AIH) **cechy patognomoniczne** dla obu tych chorób. I tak, u dzieci z **NASH** stwierdziłam w cytoplazmie **hepatocytów** obecność **megamitochondriów** (MMC) zawierających charakterystyczne, powtarzające się, równoległe ułożone **linijne wtręty** (ang. *intramitochondrial linear crystalline inclusions*) a także obserwowałam proliferację populacji **KCs/MPs**, wykazujących nadmierne pobudzenie i zjawisko znacznie wyrażonej **erytrofagocytozy**. Powiększone, zawierające fragmenty pochłoniętych erytrocytów komórki B.-Kupffera często zamykały światło naczyń zatokowych wątroby. Z kolei w przypadku **AIH**, zastosowanie TEM umożliwiło wykrycie na terenie cytoplazmy populacji **KCs/MPs** charakterystycznych, patognomonicznych dla tej choroby, śródplazmatycznych „szklistych wtrętów” (ang. *glassy droplet inclusions*), identycznych z ciałkami Russel’a pojawiającymi się na terenie komórek plazmatycznych. Zmianom w KCs/MPs towarzyszyło przekształcanie **LSECs** w tzw. **ciągły typ śródbłonka** zatok wątrobowych ale bez wytworzenia prawdziwej błony podstawnej. Zastosowanie TEM pozwoliło również dokładnie prześledzić proces **fibrogenyzy** towarzyszący tym patologiom.

Natomiast w pracy **doświadczalnej nad włóknieniem** żółciowym wątroby badania submikroskopowe bardzo dobrze identyfikowały poszczególne subpopulacje komórek macierzystych/owalnych wątroby (**HPCs/oval cells**) wskazując na ich ważną, wg mnie równorzędną, rolę z tzw. przejściowymi komórkami gwiaździstymi – **T-HSCs**, w procesie fibrogenyzy i rozwoju włóknienia. Dotyczyło to zwłaszcza komórek różnicujących się w kierunku cholangiocytołów.

Uzyskane wyniki badań ultrastrukturalnych potwierdzają potrzebę, zwłaszcza w **trudnych diagnostycznie** przypadkach NASH i AIH, szerszego stosowania **mikroskopu elektronowego transmisyjnego** jako cennego narzędzia badawczego, celem **pogłębienia** morfologicznych kryteriów rozpoznania badanej patologii. Wyniki moich badań ultrastrukturalnych mogą mieć także ważne zastosowanie w poszukiwaniu i opracowaniu nowych efektywnych strategii leczniczych pzw u dzieci, z uwzględnieniem **terapii antyfibrotycznych**.

Literatura uzupełniająca:

1. **Mehal WZ**, Azzaroli F, Crispe IN. Immunology of the healthy liver: old questions and new insights. *Gastroenterology* 2001, 120, 250-60.
2. **Guettier C**. "Which stem cells for adult liver?," *Annals De Pathologie* 2005, 25, 33-44.
3. **Yovchev ML**, Grozdanov PN, Zhou H, et al. Identification of adult hepatic progenitor cells capable of repopulating injured rat liver. *Hepatology* 2008, 47, 636-47.
4. **He Z**, Feng M. Activation, isolation, identification and culture of hepatic stem cells from porcine liver tissues. *Cell Proliferation* 2011, 44, 558-66.
5. **Brunt EM**, Kleiner DE, Wilson LA et al. Portal chronic inflammation in nonalcoholic liver disease (NAFLD): a histologic marker of advanced NAFLD-Clinicopathologic correlations from the nonalcoholic steatohepatitis clinical research network. *Hepatology* 2009,49, 809–20.
6. **Basaranoglu M**, Basaranoglu G, Sentürk H. From fatty liver to fibrosis: A tale of "second hit". *World J Gastroenterol.* 2013, 19, 1158-65.
7. **Caldwell SH**, Lee VD, Kleiner DE, et al. NASH and cryptogenic cirrhosis: a histological analysis. *Ann Hepatol.* 2009, 8, 346-52.
8. **Otogawa K**, Kinoshita K, Fujii H, et al. Erythrophagocytosis by liver macrophages (Kupffer cells) promotes oxidative stress, inflammation, and fibrosis in a rabbit model of steatohepatitis:



- implications for the pathogenesis of human nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Pathol.* 2007, 170, 967–80.
9. **Kawada N**, Otagawa K. Role of oxidative stress and Kupffer cells in hepatic fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007, 22, S85–6.
10. **Sobaniec-Lotowska ME**, Lebensztejn DM, Lotowska JM, et al. Ultrastructure of liver progenitor/oval cells in children with nonalcoholic steatohepatitis. *Adv in Med Science* **2011**, 56, 172-179
11. **Farrell GC**, Teoh NC, McCuskey RS. Hepatic microcirculation in fatty liver disease. *Anat Rec (Hoboken).* 2008, 291, 684-92
12. **Kiki I**, Altunkaynak BZ, Altunkaynak ME, et al. Effect of high fat diet on the volume of liver and quantitative feature of Kupffer cells in the female rat: a stereological and ultrastructural study. *Obes Surg.* 2007, 17, 1381–8.
13. **de Boer YS**, van Nieuwkerk CM, Witte BI, et al. Assessment of the histopathological key features in autoimmune hepatitis. *Histopathology* 2015, 66, 351-62.
14. **Radhakrishnan KR**, Alkhouri N, Worley S, et al. Autoimmune hepatitis in children--impact of cirrhosis at presentation on natural history and long-term outcome. *Dig Liver Dis.* 2010, 42, 724-8.
15. **Soares JC**, Borgonovo A, Maggi DC, et al. Liver dysfunction and fibrosis as predictors of biochemical response to autoimmune hepatitis treatment. *Minerva Gastroenterol Dietol.* 2016, 62, 138-47.
16. **Gossard AA**, Lindor K. Autoimmune hepatitis: a review. *J Gastroenterol* 2012;47:498-503.
17. **Mieli-Vergani G**, Vergani D, Baumann U, et al. Diagnosis and Management of Pediatric Autoimmune Liver Disease: ESPGHAN Hepatology Committee Position Statement. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2018, 66, 345-60.
18. **Schuppan D**. Liver fibrosis: Common mechanisms and antifibrotic therapies. *Clinics and Res Hepatol Gastroenterol.* 2015, 39, Suppl. 1, S51-9.
19. **Friedman SL**. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev.* 2008, 88, 125-78.
20. **Clouston AD**, Powell EE, Walsh MJ et al. Fibrosis correlates with a ductular reaction in hepatitis C: roles of impaired replication, progenitor cells and steatosis. *Hepatology* 2005, 41, 809-18.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.

W latach 2001-2007 studiowałam na Wydziale Lekarskim Akademii Medycznej w Białymstoku. Przez okres studiów otrzymywałam stypendium za wysokie osiągnięcia w nauce. W 2007/2008 roku odbyłam roczny staż podyplomowy w Specjalistycznym Państwowym Szpitalu Klinicznym w UM w Białymstoku oraz zdałam Lekarski Egzamin Państwowy.

W 2004 r. odbyłam 2 tygodniową studencką praktykę zagraniczną w Klinice Gastroenterologii i Hepatologii Uniwersytetu w Bochum, Niemcy (BG-Kliniken Bergmannsheil, Universitätsklinik, Bochum; Kierownik Kliniki: Professor Dr. med. Wolf Schmiegel). W czasie studiów należałam do dwóch studenckich kół naukowych. Od 2002r. do 2007r., t. j. przez 5 lat, aktywnie działałam w Studenckim Kole Naukowym przy Zakładzie Patomorfologii Lekarskiej AMB (Kierownikiem Zakładu był Pan Profesor dr hab. Stanisław Sulkowski). W latach 2006 - 2007 uczestniczyłam w pracach Studenckiego Koła Naukowego przy Klinice Neurologii i Rehabilitacji Dziecięcej AMB (Kierownikiem Kliniki był Pan Profesor dr hab. Wojciech Sobaniec). Współpraca z neuropediatrami trwa do chwili obecnej, co zaowocowało cyklem prac w *Folia Neuropathologica*, a także poszerzona została o badania z zakresu neurofizjologii prowadzone z interdyscyplinarnym zespołem badaczy z Instytutu Neurofizjologii „*Neuromaster*” w Białymstoku.

Realizowana tematyka badawcza głównie dotyczy hepatopatologii wieku rozwojowego i hepatologii doświadczalnej a także neuropatologii doświadczalnej nad lekami przeciwpadaczkowymi i problemami diagnostyki neurofizjologicznej u dzieci.

Na podkreślenie zasługuje mój wieloletni ścisły kontakt naukowy z Fundacją Falka, tj. *Falk Foundation e. V. (Leinenweberstr.5; 79108 Freiburg/Germany)*, która jest jednym z głównych międzynarodowych organizatorów spotkań naukowych poświęconych tematyce hepatologicznej i gastroenterologicznej. Uczestniczyłam w licznych sympozjach i konferencjach międzynarodowych a także w warsztatach naukowych organizowanych przez tę Fundację prezentując prace na temat ultrastruktury zmian patologicznych wątroby i z zakresu gastroenterologii. Np. w dn. 12-18.10.2004r. brałam czynny udział w międzynarodowym szkoleniu naukowym we Freiburgu, Niemcy, *Gastroenterology Week Freiburg*. W sesji poświęconej autoimmunizacyjnemu zapaleniu wątroby ustnie prezentowałam wyniki swoich badań, podobnie jak w ramach warsztatów naukowych dotyczących przewlekłych chorób wątroby podczas tzw. *Falk Workshop Translation Research in Chronic Liver Diseases*, Heidelberg, Niemcy 29-30.01.2009 r., *Falk Symposium 186, Challenges of Liver Cirrhosis and Tumors*, Mainz, Niemcy 05-06.10.2012r., czy *Falk Symposium 211, XXV International Bile Acid Meeting*, Dublin, Irlandia 06-07.06.2018r. Natomiast jednymi z ważniejszych krajowych spotkań

poświęconych patologii wątroby, w których w ostatnich latach uczestniczyłam, było szkolenie naukowo-diagnostyczne w ramach Konferencji Konsultacyjnej zorganizowanej przez Krajową Grupę Ekspercką ds. Schorzeń Wątroby, Katedra Patomorfologii, UJ, Kraków, 30.08-01.09.2012r. a także sesja hepatologiczna w czasie XX Jubileuszowego Zjazdu PTP, Warszawa 02-04.06.2016r.

W 2012 roku obroniłam rozprawę doktorską pt. „*Komórki gwiaździste wątroby u dzieci z przewlekłym zapaleniem wątroby typu B,*” wyróżnioną na wniosek recenzentów. W 2015 roku uzyskałam tytuł specjalisty w dziedzinie patomorfologii i zostałam zatrudniona jako starszy asystent w Pracowni Histopatologicznej i Cytologicznej Wojewódzkiego Szpitala Zespólnego im. J. Śniadeckiego w Białymstoku a także w Akademickim Ośrodku Diagnostyki Patomorfologicznej i Genetyczno-Molekularnej w Białymstoku. Moja działalność naukowo-badawcza była i jest nadal ściśle związana ze specjalizacją, w ramach której prowadzę diagnostykę histopatologiczną, poszerzoną o elementy histochemii, immunohistochemii i mikroskopii elektronicznej transmisyjnej. Diagnostuję materiał biopsyjny, w tym śródoperacyjny i cytologiczny, który wykorzystywany jest do badań naukowych. W czasie swojej pracy naukowo-badawczej byłam kierownikiem dwóch i współwykonawcą siedmiu projektów o naukowym i wdrożeniowym charakterze w ramach działalności statutowej Uczelni, z których większość związana była z oceną ultrastrukturalną wątroby w wybranych patologiach tego narządu.

#### **A. Główna tematyka prac badawczych:**

Od początku pracy naukowej moje zainteresowania naukowe skupiały się na **hepatopatologii wieku rozwojowego**, głównie na badaniach morfologicznych komórek bezpośrednio związanych z fibrogenezą i rozwojem włóknienia wątroby i komórek współuczestniczących w tej patologii - komórek gwiaździstych wątroby (HSCs) i komórek macierzystych wątroby (HPCs) w materiale oligobiopsyjnym pochodzącym od dzieci z pzw typu B i NASH (współpraca z Panem Profesorem dr hab. Dariuszem Lebensztejnem). Wyniki badań, po raz pierwszy prezentowane w literaturze hepatologicznej, uwzględniają sekwencję zmian morfologicznych w przebiegu fibroplazji kolagenowej.

Innym bardzo ważnym kierunkiem moich zainteresowań a także prowadzonych badań była **neuropatologia doświadczalna** i obserwacje kliniczne z zakresu **neurologii dziecięcej** dotyczące wybranych zaburzeń oun u dzieci, zwłaszcza **autyzmu**. Tematyka neurologiczna stanowi kontynuację działalności w Studenckim Kole Naukowym przy Klinice Neurologii Dziecięcej UMB.

Pozostały dorobek naukowy można podzielić na następujące tematy badawcze:

**a/ Z zakresu hepatopatologii wieku rozwojowego, opublikowane przed złożeniem pracy doktorskiej, dotyczące oceny ultrastrukturalnej poszczególnych typów populacji nisko zróżnicowanych, multipotencjalnych komórek macierzystych wątroby (HPCs/oval cells), zwłaszcza komórek pośrednich różnicujących się w kierunku linii hepatocelularnej (ang. *intermediate hepatocyte – like cells - IHCs*) i towarzyszących im pobudzonych NPCs u dzieci z pzw typu B i w przebiegu NASH.**

Wyniki uzyskanych badań submikroskopowych wskazują na istotny udział populacji komórek macierzystych wątroby w morfogenezie i progresji badanego schorzenia (pzw typu B i NASH) a także w procesie włóknienia narządu. Godny podkreślenia jest fakt, iż w przebiegu pzw typu B komórki różnicujące się w kierunku hepatocytów, tj. IHCs wykazywały wyraźne zmiany zwyrodnieniowe, głównie mitochondrialne i dotyczące kanałów sieci śródplazmatycznej ziarnistej, czemu towarzyszyło znaczne nasilenie procesu włóknienia. Wyniki nowatorskich badań ultrastrukturalnych dotyczące zwyrodnieniowych IHCs i ich udziału w procesie fibrogenyzy opisałam w *Eur J Gastroenterol Hepatol* (2010).

Do wyżej omówionej tematycznej grupy publikacji należą:

1. Sobaniec-Łotowska ME, **Łotowska JM**. Ultrastructure of oval cells in children with chronic hepatitis B, with special emphasis on the stage of liver fibrosis. The first pediatric study. *World J Gastroenterol* **2007**; 13, 2918-22. KBN/MNiSW - 20

2. **Łotowska JM**, Sobaniec-Łotowska ME, Lebensztejn DM. Electron microscopic alterations in intermediate hepatocyte-like cells in children with chronic hepatitis B. The first report in pediatric patients. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **2010**, 22, 741-747.

IF -1,598; KBN/MNiSW – 20

3. Sobaniec-Łotowska ME, Lebensztejn DM, **Łotowska JM**, Kańczuga-Koda L, Sulkowski S: Ultrastructure of liver progenitor/oval cells in children with nonalcoholic steatohepatitis. *Adv in Med Sciences* **2011**, 56, 172-179.

IF - 0,952; KBN/MNiSW - 15

**b/ Badania immunohistochemiczne (IHC) i mikroskopowo-elektronowe nad populacją komórek gwiaździstych wątroby u dzieci z pzw typu B, przeprowadzone na obszernym retrospektywnym materiale oligobiopsyjnym wątroby (70 pacjentów) zgromadzonym w Zakładzie Patomorfologii Lekarskiej UMB.**

Przeprowadzone przeze mnie badania immunohistochemiczne (IHC) z zastosowaniem biomarkera włóknienia (białka alfa-SMA), stanowiące kontynuację pracy doktorskiej, wyraźnie identyfikowały populację immunoreaktywnych komórek gwiaździstych wątroby

(HSCs) w powiązaniu z ze **stopniem zaawansowania włóknienia** narządu (*staging - S*). Wykazałam ścisłą korelację pomiędzy **liczbą** i obrazem IHC badanych komórek a nasileniem procesu fibroplazji kolagenowej, co może być ważnym czynnikiem prognostycznym w rozwoju i narastaniu zasięgu włóknienia w przebiegu tej choroby. Im większy był stopień zaawansowania włóknienia narządu (S) tym większą liczbę immunoreaktywnych HSCs obserwowałam na terenie zrazika wątrobowego. Wydaje się ważne, że najmniejszą średnią liczbę immunoreaktywnych HSCs odnotowałam w strefie okołowrotnej zrazika, co może wskazywać, że obszar ten jest najmniej czynny metabolicznie w procesie włóknienia u dzieci z pzw typu B.

Natomiast obszerniejsze studium na temat analizy populacji komórek gwiaździstych wątroby na poziomie **mikroskopii elektronowej transmisyjnej** dotyczyło poszczególnych form morfologicznych HSCs, w szczególności **formy aktywnej, tj. przejściowej -T-HSCs** a także analizy **interakcji komórkowych** pomiędzy HSCs a przylegającymi innymi nieparenchymalnymi komórkami wątroby w procesie fibrogenyzy narządu u dzieci z pzw typu B. U pacjentów z intensywnym włóknieniem wątroby (S-2 i S-3) obserwowałam prawie całkowite zastąpienie spoczynkowych HSCs (Q-HSCs) komórkami o charakterze T-HSCs, Wśród T-HSCs wyróżniłam 2 typy komórek, w tym po raz pierwszy opisane przeze mnie w literaturze komórki o charakterze „zainicjowania” pobudzenia, określone jako ang. *exhibiting initiation of activation* (**Ti-HSCs**), którym niejednokrotnie towarzyszyły pobudzone komórki B.-Kupffera. Drugim typem T-HSCs były komórki wykazujące cechy „utrwalonego” pobudzenia ang. *exhibiting features of perpetuation activation* (Tp-HSCs). W pracy zwróciłam uwagę na kluczową rolę subpopulacji Ti-HSCs w zapoczątkowaniu procesu fibrogenyzy. Przeprowadzone przeze mnie badania pozwoliły ustalić, że **T-HSCs** stanowiły bardzo istotne **ogniwo łączące** pomiędzy Q-HSCs a tzw. *miofibroblastycznymi* HSCs (Mf-HSCs). Podkreśliłam wyjątkowe cechy morfologiczne HSCs obserwowane w procesie włóknienia, które wskazują na ang. *an example of high fibroblastic cell plasticity*. Lepsze poznanie biologii NPCs, zwłaszcza komórek gwiaździstych wątroby i komórek B.-Kupffera, stanowi kolejny krok w kierunku poszukiwania efektywnych terapii procesu fibrogenyzy w pzw typu B.

W ramach tematyki hepatologicznej mieści się także praca morfologiczno-kliniczna na temat hepatotoksycznego wpływu montelukastu (CystLTRA) stosowanego u pacjenta pediatrycznego w terapii astmy o podłożu alergicznym.

Do powyższych publikacji należą:

1. **Łotowska JM**, Lebensztejn DM. Immunoreactive hepatic stellate cells in chronic hepatitis B in children. The first report in pediatric patients. *Pol J Pathol*, **2015**, 66, 224-230. IF – 1,240; KBN/MNiSW – 15

2. **Lotowska JM**, Sobaniec-Lotowska ME, Lebensztejn DM. Ultrastructural characteristics of the respective forms of hepatic stellate cells in chronic hepatitis B as an example of high fibroblastic cell plasticity. The first assessment in children. *Advance in Medical Sciences*, **2018**, 63, 127-133. IF – 2,064; KBN/MNiSW – 15
3. Lebensztejn DM, Borus-Chociej A, Kłusek M, **Lotowska J**, Sobaniec-Lotowska M, Kaczmarek M: Hepatotoxicity caused by montelukast in a paediatric patient. *Przegląd Gastroenterologiczny* **2014**, 9, 121-123. KBN/MNiSW – 15

**c/ Nowatorskie badania z zakresu neuropatologii doświadczalnej nad wpływem niektórych leków przeciwpadaczkowych (ang. *antiepileptic drugs* – AEDs) na obraz mikroskopowo-elektronowy wybranych elementów strukturalnych ośrodkowego układu nerwowego - oun.**

Pierwsza praca dotyczyła długotrwałego wpływu **walproinianu sodu - VPA** - podstawowego, o szerokim spektrum działania leku przeciwpadaczkowego i antypsychotycznego - (Vupral, f. Polfa podawany szczurom codziennie, dożołądkowo, w dawce 200 mg/kg m.c. przez 1, 3, 6, 9 i 12 miesięcy) na obraz populacji komórek astrogleju i nerwonów jądra ogoniastego mózdzku w wypracowanym przez nasz Ośrodek (Klinika Neurologii Dziecięcej UMB) modelu czystych zmian polekowych o charakterze tzw. doświadczalnej encefalopatii walproinianowej. W ostatnich fazach doświadczenia obserwowano neurotoksyczny wpływ przewlekłego stosowania VPA na obraz ultrastrukturalny astrogleju protoplazmatycznego i komórek nerwowych a także neuropilu i elementów bariery krew-mózg jądra ogoniastego.

Następnie w swoich badaniach neuropatologicznych nad lekami przeciwpadaczkowymi skoncentrowałam się na ocenie mikroskopowo-elektronowej neuroprotekcijnego wpływu **topiramatu (TPM)** - szeroko wachlarzowego antyepileptyku nowszej generacji (ang. *newer-generation antiepileptic drug*) - na wybrane elementy strukturalne oun w **modelu drgawek gorączkowych** (ang. *febrile seizures*) - **FS**. Badania te, z zespołem neuropediatrów, przeprowadziliśmy na własnym, oryginalnym modelu doświadczalnym FS, który jest porównywalny do drgawek gorączkowych u pacjentów pediatrycznych. Warto dodać, że tak jak obserwacje kliniczne i neurofarmakologiczne nad topiramatem są liczne, tak badania neuropatologiczne, zwłaszcza przy użyciu TEM należą do rzadkości. Jak wynika z danych z piśmiennictwa badania ultrastrukturalne nad tym antyepileptykiem zostały podjęte po raz pierwszy przez nasz Ośrodek.

Obserwacje przy użyciu TEM koncentrowały się na ocenie zmian zwyrodnieniowych wywołanych stresem hipertermicznym u młodych szczurów i potencjalnych właściwościach ochronnych TPM w drgawkach gorączkowych (Topamax, f. Jaansen – Cilag, podawany w dawce

80 mg/kg m. c. sondą dożołądkowo) w stosunku do niektórych elementów strukturalnych oun (bariery krew-mózg; astrogleju; komórek nerwowych) w wybranych obszarach oun, tj. sektorach **CA1 i CA3** kory zakrętu hipokampa i **korze nowej** płata skroniowego. Na podstawie przeprowadzonych badań ultrastrukturalnych stwierdziłam, że lek stosowany „profilaktycznie”, tj. przed wywołaniem drgawek gorączkowych wykazywał wyraźne **działanie protekcyjne** w stosunku do elementów **bariery krew-mózg**, zwłaszcza komórek śródbłonna naczyń. Korzystny wpływ TPM (*“beneficial”* effect) dotyczył przeszło połowy naczyń włosowatych mikrokrażenia w obrębie sektorów CA1 i CA3 kory amonalnej.

Także **neuroprotekcyjny**, choć słabiej wyrażony, wpływ antyepileptyku obserwowalam w stosunku do populacji **astrogleju** protoplazmatycznego **kory amonalnej** i **kory nowej** płata skroniowego i **neuronów piramidowych** sektorów **CA1 i CA3** kory zakrętu hipokampa. Natomiast TPM podawany po wywołaniu FS nie powodował działania neuroprotekcyjnego w stosunku do analizowanych elementów mikroskopowych oun.

Powyższe badania neuropatologiczne nad ocenianymi AEDs były realizowane pod kierownictwem Pana Profesora dr hab. Wojciecha Sobańca. Uzyskane wyniki stanowią interesujący materiał porównawczy dla podobnych obserwacji ultrastrukturalnych nad antyepileptykami prowadzonych przez inne Ośrodki neuropatologiczne a także zachęcić do poszukiwań nowych strategii klinicznych w prewencji drgawek gorączkowych u dzieci, zwłaszcza drgawek nawracających i przedłużających się.

Doświadczenia uzyskane w dziedzinie neuropatologii zostały podsumowane w cyklu prac w *Folia Neuropathologica*:

1. Sobaniec-Łotowska ME, **Łotowska JM**. Ultrastructural study of cerebellar dentate nucleus astrocytes in chronic experimental model with valproate. *Folia Neuropathol* **2005**; 43, 166-171. IF - 0,346; KBN/MNiSW - 10
2. **Łotowska JM**, Sobaniec-Łotowska ME, Sendrowski K, Sobaniec W, Artemowicz B. Ultrastructure of the blood-brain barrier of the gyrus hippocampal cortex in an experimental model of febrile seizures and with the use of a new generation antiepileptic drug – topiramate. *Folia Neuropathol* **2008**; 46, 57-68. IF – 1,095; KBN/MNiSW – 20
3. **Łotowska JM**, Sobaniec-Łotowska ME, Sobaniec W: Ultrastructural features of astrocytes in the cortex of the hippocampal gyrus and in the neocortex of the temporal lobe in an experimental model of febrile seizures and with the use of topiramate. *Folia Neuropathol* **2009**; 47, 268-277. IF - 1,143; KBN/MNiSW - 20
4. Sobaniec-Lotowska ME, **Łotowska JM**: The neuroprotective effect of topiramate on the ultrastructure of pyramidal neurons of the hippocampal CA1 and CA3 sectors in an experimental model of febrile seizures in rats. *Folia Neuropathol*. **2011**, 49, 230-6. IF - 1,234; KBN/MNiSW - 20

**d/ Badania z zakresu neurologii dziecięcej koncentrujące się na wykorzystaniu diagnostyki neurofizjologicznej (EEG, QEEG, EMG) w wybranych zaburzeniach neurologicznych u dzieci, m.in. całościowych zaburzeniach rozwoju, w ich rozpoznawaniu i terapii.**

Przeprowadzone badania neurofizjologiczne dotyczyły pacjentów pediatrycznych z autyzmem, bólami głowy i padaczką. Dokonano również analizy rozwoju językowego u dzieci z zaburzeniami ze spektrum autyzmu i ich diagnozy. Oceniono skuteczność multidyscyplinarnej terapii w oparciu o zastosowane leczenie logopedyczne, metodę/terapię biofeedback (metoda biologicznego sprzężenia zwrotnego) i inne oddziaływanie fizjoterapeutyczne. Diagnostyka i terapia realizowane były przez interdyscyplinarny zespół (neuropediatra, elektrofizjolog, psycholog, logopeda, patomorfolog, fizjoterapeuta) z Kliniki Neurologii Dziecięcej UMB i Instytutu Neurofizjologii „*Neuromaster*” w Białymstoku pod kierunkiem Pana Profesora dr hab. Wojciecha Sobańca.

Do powyższych publikacji należą:

1. Sobaniec P, Szukiel B, Batruch E, Kruk U, ***Łotowska J***. Impact of multidisciplinary therapy on the functioning of children with autism. Results of the “Supporting the development of children with autism” project using the ATEC form. *Neurologia Dziecięca*. **2017**, 26, 31-37. KBN/MNiSW - 11
2. Szukiel B, Sobaniec P, Batruch E, Kruk U, ***Łotowska J***. Assessment of speech and communication disorders in preschool-aged children with autism. *Neurologia Dziecięca* **2018**, 27(54), 15 pp. KBN/MNiSW - 11
3. Szukiel B, Bogusz I, Słoma M, ***Łotowska JM***. Logopedyczne metody i formy terapii dzieci z całościowymi zaburzeniami rozwojowymi. Tytuł całości: Promocja, edukacja zdrowotna oraz profilaktyka w naukach medycznych. Tom I. Pod red: Barbary Jankowiak, Beaty Kowalewskiej, Elżbiety Krajewskiej-Kułąk, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, **2018**, 72-85. KBN/MNSiW - 4
4. Szukiel B, Kulmacz A, Słoma M, Sobaniec P, ***Łotowska JM***. Terapia logopedyczna dziecka w wieku przedszkolnym z opóźnionym rozwojem mowy. Tom I. Pod red: Barbary Jankowiak, Beaty Kowalewskiej, Elżbiety Krajewskiej-Kułąk, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, **2018**, 164-177 KBN/MNSiW - 4
5. Sobaniec P, ***Łotowska JM***, Czerpak K, Szukiel B, Żochowska-Sobaniec M, Nowak K. The effect of EMG-biofeedback in the treatment of tension-type headache: A pilot study. *Polish Journal of Applied Science* **2018**, 4(2), 67-73 (w druku).

**e/ Badania skupiające się na wybranych zagadnieniach z zakresu patologii przewodu pokarmowego - trzy opracowania - w tym dwa dotyczące tkanek miękkich jamy ustnej.**

Szczególnie interesujące były badania naukowe prowadzone w ramach współpracy wielośrodkowej ogólnopolskiej z Katedrą i Zakładem Propedeutyki i Fizykodiagnostyki Stomatologicznej Pomorskiego UM w Szczecinie, kierowanym przez Panią Profesor dr hab.



Krystynę Opalko. Zaowocowały pracą immunohistochemiczną, z wykorzystaniem biomarkera śródbłonna naczyń CD31, na temat procesu angiogenezy tkanek miękkich jamy ustnej u pacjentów stomatologicznych ze śródkostnymi tytanowymi implantami typu Alpha-Bio poddanych ekstremalnie niskim częstotliwościom pola magnetycznego.

Druga praca dotyczy analizy histopatologicznej obszernej grupy 114 przypadków zmian rozrostowych błony śluzowej jamy ustnej, wcześniej określanych nadziąślakami, ze szczególnym uwzględnieniem procesu metaplastyki kostnej, zgromadzonych w materiale biopsyjnym Zakładu Patomorfologii Lekarskiej UMB.

W cyklu tym mieści się też opracowanie na temat czułych, nieinwazyjnych markerów zapalenia, wykrywanych w kale i w surowicy krwi u dzieci z nieswoistą chorobą zapalną jelit, szczególnie użytecznych w diagnostyce choroby Crohna.

Do powyższych publikacji należą:

1. Sobaniec-Łotowska ME, Sidorska M, *Łotowska JM*, Opalko K, Bułatowicz I, Dojs A, Łotowski WJ: Immunoreactivity of CD31 Protein in Endothelial Cells of Microcirculation in the Oral Soft Tissues in Patients with Intra-Osseous Titanium Implants Subjected to Extremely Low Frequency Magnetic Fields. The First Report in Prosthetic Patients. *Pol J Environmental Studies*. **2011**, 20(3), 763-769. IF - 0,508; KBN/MNiSW - 15
2. Denisewicz K B, *Łotowska JM*, Małyszko M, Sobaniec-Łotowska ME. Analiza histopatologiczna 114 przypadków nadziąślaków w materiale biopsyjnym ze szczególnym uwzględnieniem procesu metaplastyki kostnej. *Czas Stomatol* **2007**; 60(5), 306-311. KBN/MNiSW - 9
3. Daniluk U, Daniluk J, Krasnodebska M, *Łotowska JM*, Sobaniec-Lotowska ME, Lebensztejn DM. The combination of fecal calprotectin with ESR, CRP and albumin discriminates more accurately children with Crohn's disease. *Adv in Med Sciences*, **2019**, 64(1), 9-14. IF - 2,064; KBN/MNiSW - 15

#### **f/ Badania nad czynnikami prognostycznymi u pacjentów z rakiem jelita grubego i rakiem piersi.**

Pozostały dorobek naukowy dotyczy tematyki onkologicznej, w ramach której prowadziliśmy ocenę białek związanych z niedotlenieniem komórek nowotworowych (HIF-1alpha, EPO i EPOR a także IGF-1, VEGF) w progresji raka jelita grubego oraz białek związanych z procesem apoptozy w odniesieniu do profilaktyki receptorowego raka piersi.

Do powyższych publikacji należą:

1. Sulkowski S, Wincewicz A, Zalewski B, Famulski W, *Łotowska JM*, Koda M, Sobaniec-Lotowska ME, Mysliwiec M, Baltaziak M, Pawlak K, Sulowska M: Hypoxia related growth factors and P53 in preoperative sera of colorectal cancer patients - evaluation of prognostic significance of these agents. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, **2009**, 47(3), 1439-1445. IF - 1,886; KBN/MNiSW - 27

2. Baltaziak M, Wincewicz A, Kanczuga-Koda L, **Lotowska JM**, Koda M, Sulkowska U, Baltaziak M, Podbielski M, Sobaniec-Lotowska ME, Sulkowski S. The relationships between hypoxia-dependent markers: HIF-1alpha, EPO and EPOR in colorectal cancer. *Folia Histochem Cytobiol*, **2013**, 51(4), 320-325. IF - 1.000; KBN/MNiSW - 15

3. Kanczuga-Koda L, Koda M, Tomaszewski J, Jarzabek K, **Lotowska J**, Baltaziak M, Sulkowska U, Sobaniec-Lotowska M, Sulkowski S. ER $\alpha$  and Er $\beta$  expression in correlation with Ki-67, Bcl-2 and Bak in primary tumors and lymph node metastases of breast cancer: The effect of pre-operative chemotherapy. *Oncology Letters*, **2010**, 1, 1067-1071. KBN/MNiSW - 2

## **B. Dane bibliometryczne:**

Podsumowując jestem autorem łącznie **76** publikacji naukowych (w tym **26** pełnotekstowych prac naukowych i **50** streszczeń zjazdowych). **24** publikacje to oryginalne pełnotekstowe prace twórcze (w tym **5** prac stanowi rozprawę habilitacyjną), **2** publikacje to pełnotekstowe, oryginalne prace naukowe zamieszczone jako rozdziały w monografiach.

Pozostałe **50** publikacji to streszczenia zjazdowe. Wyniki badań były opublikowane w materiałach z konferencji/sympozjów naukowych w formie **15** streszczeń ze zjazdów krajowych i **35** streszczeń ze zjazdów międzynarodowych.

**Sumaryczny Impact Factor** oryginalnych opublikowanych prac twórczych wynosi **25,839** punktów, w tym osiągnięcie naukowe wynosi **10,709** punktów.

**Łączna wartość punktacji MNiSW** wynosi **393** punktów, w tym oryginalnych pełnotekstowych opublikowanych prac twórczych wynosi **385** punkty i pełnotekstowych prac twórczych opublikowanych jako rozdziały w monografiach **8** punktów. Osiągnięcie naukowe wynosi **110** punktów wg punktacji MNiSW.

Liczba cytowań moich publikacji zgodnie z Web of Science Core Collection (WoS) wynosi **93**.

Liczba cytowań moich publikacji zgodnie z Web of Science All Databases Collection (WoS) wynosi **100**. **Index Hirscha** wg bazy **Web of Science** wynosi **6**.

*Joanna Lotowska*

Białystok, 25.03.2019 r.