

Łódź, 12 stycznia 2021 r.

Prof. dr hab. Barbara Wachowicz

Ocena

**pracy doktorskiej lek. wet. Kazimierzy Pyśniak
pt.: „Analiza wybranych parametrów procesu megakariocytopoezy u
myszy z mutacją c-Mpl w pokoleniu F2 z krzyżówki
(BALB/cW x C57BL/6J-Mpl^{hlb219}/J)”**

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska lek. wet. Kazimierzy Pyśniak została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Jerzego Windygi w Narodowym Instytucie Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie PIB w Warszawie. Wybór tematu i poprawność jego sformułowania oceniam pozytywnie. Biorąc pod uwagę znaczenie przedstawionego problemu badawczego i roli mechanizmów powstawania płytek krwi, wybór tematu recenzowanej pracy doktorskiej uważam za bardzo aktualny i relewantny, świadczący o zainteresowaniach Autorki szeroko pojętą tematyką badawczą procesu megakariocytopoezy i trombopoezy realizowaną na modelu mysim.

Zespół mechanizmów utrzymujących stan płynny krwi krążącej w naczyniach krwionośnych i powodujących zahamowanie krwawienia po uszkodzeniu ściany naczynia jest określany jako proces hemostazy, w którym istotną rolę odgrywają przede wszystkim osoczowe czynniki krzepnięcia oraz wyspecjalizowane, bezjądrzaste u ssaków i najmniejsze komórki krwi zwane płytkami krwi. Termin „płytki krwi” odnosi się tylko do pozbawionych jąder komórek krwi ssaków, a nazwa „trombocyt” jest zarezerwowana dla jądrzastych komórek innych kręgowców pełniących te same funkcje (np. u ptaków). Dzięki mechanizmom regulującym trombopoezę organizm utrzymuje stałą liczbę płytek krwi. U człowieka czas życia płytek krwi w krążeniu wynosi 9-12 dni.

Wyjaśnienie złożonych mechanizmów odpowiedzialnych za prawidłowy przebieg procesu megakariocytopoezy, tj. różnicowania i dojrzewania oraz tworzenia płytek krwi jest przedmiotem badań wielu ośrodków naukowo-badawczych, a poznanie przebiegu procesów prowadzących do powstawania tych najmniejszych komórek pełniących istotną rolę w krzepnięciu krwi budzi szczególne zainteresowanie nie tylko hematologów. Do wyjaśnienia złożonych mechanizmów megakariocytopoezy jako narzędzie badawcze wykorzystuje się modele zwierzęce. Wyjątkowo przydatnym narzędziem badawczym okazały się modele mysie wykorzystywane również do badań eksperymentalnych służących do opracowania nowych metod leczenia. Dzięki opracowaniu i wykorzystaniu modeli zwierzęcych możliwe jest także wyjaśnienie patofizjologicznych mechanizmów odpowiedzialnych za choroby człowieka związane zarówno z liczbą powstających płytek jak i ich funkcją. Dlatego też podjęte przez Autorkę badania uważam za niezwykle interesujące i potrzebne, pozwalające na lepsze zrozumienie mechanizmów megakariocytopoezy i trombopoezy. Na przeprowadzenie badań na modelu mysim Autorka uzyskała zgodę II Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie (Uchwała Nr 15/2009).

Zasadniczym celem prowadzonych badań na modelu mysim było:

- poznanie zależności mutacji Mpl^{hlb219} w genie receptora dla trombopoetyny c-Mpl od wystąpienia zaburzeń liczby płytek krwi w modelu mysim (pokolenie F2 z krzyżówki BALB/cW x C57BL/6J- Mpl^{hlb219}/J);
- określenie zależności mutacji- Mpl^{hlb219} w genie c- Mpl^{hlb219} od stężenia trombopoetyny, erytropoetyny i interleukiny 11 w surowicy krwi obwodowej;
- poszukiwanie zależności między stężeniem cytokin a liczbą megakariocytów w szpiku kostnym i liczbą płytek we krwi obwodowej badanych myszy;
- ocena wpływu mutacji w genie c- Mpl^{hlb219} na stopień dojrzałości megakariocytów w szpiku kostnym.

Autorka zamieściła we Wstępie opis złożonego procesu hematopoezy i opisała udział komórek uczestniczących w tym procesie. Zamieściła charakterystykę megakariocytów. W kolejnych rozdziałach opisała megakariocytopoezę jako złożony proces związany z różnicowaniem i dojrzewaniem tych komórek, a regulowany przy udziale cytokin i czynników transkrypcyjnych. Szczególną uwagę zwróciła na zaburzenia liczby płytek zależne od trombopoetyny i jej receptora. Opisała też szczegółowo stosowane do badań

modele mysie. Należy podkreślić, że proces megakariopoezy jest regulowany przede wszystkim przez trombopoetynę. Na stężenie trombopoetyny w surowicy krwi obwodowej mają istotny wpływ dostępne receptory c-Mpl obecne zarówno na płytkach krwi jak i na progenitorach megakariocytów. W kolejnych rozdziałach w części Materiał i Metody zostały opisane: materiał biologiczny wykorzystywany do badań (myszy z mutacją c-Mpl w pokoleniu F2 z krzyżówki (BALB/cW x C57BL/6J - *Mpl*^{hlb219}/J), stosowane odczynniki i bardzo szeroki wachlarz stosowanych metod, m.in. metody oznaczania liczby płytek, czasu krzepnięcia, genotypowania, barwienia hematoksyliną i eozyną oraz metody immunohistochemiczne, immunoenzymatyczne i morfometryczne. Otrzymane wyniki przeprowadzonych badań zostały poprawnie opracowane statystycznie.

Należy podkreślić, że Autorka wykorzystała do badań różnorodny materiał biologiczny, wykazała się też niezwykle bogatym warsztatem badawczym. Zastosowała precyzyjne analizy immunohistochemiczne, immunoenzymatyczne i morfometryczne. Wyniki badań histopatologicznych szpiku kostnego myszy z pokolenia krzyżówki BALB/cWxC57Bl/6J-*Mpl*^{hlb219}/J przedstawione zostały na 15 barwnych fotografiach.

Otrzymane wyniki, które wymagały długotrwałych, precyzyjnych, niezmiernie czasochłonnych badań i analiz wskazują, że u badanych myszy mutacje *Mpl*^{hlb219} w genie receptora dla trombopoetyny prowadzą do zaburzeń liczby płytek we krwi obwodowej. Zaburzenia zależą od tego, czy mutacja występuje w jednym czy w obu allelach. Małopłytkowość zaobserwowano u homozygot, natomiast u heterozygot występowała małopłytkowość cykliczna lub nadpłytkowość. Jak wykazano, mutacja *Hlb*²¹⁹ w genie *Mpl* u myszy homozygotycznych z małopłytkowością powoduje dwukrotny wzrost stężenia interleukiny 11 i aż ośmiokrotny wzrost stężenia trombopoetyny w surowicy krwi obwodowej, a w szpiku kostnym zmniejszenie liczby i pola powierzchni megakariocytów w stosunku do grupy kontrolnej. U myszy heterozygotycznych z nadpłytkowością wykazano w surowicy krwi obwodowej wzrost stężenia erytropoetyny, trombopoetyny i interleukiny 11, natomiast w szpiku kostnym zaobserwowano tylko nieznaczny wzrost pola powierzchni megakariocytów w porównaniu do grupy kontrolnej. U myszy heterozygotycznych z małopłytkowością cykliczną w okresach wzrostu liczby płytek wraz ze wzrostem stężenia erytropoetyny w surowicy krwi obwodowej, pole powierzchni megakariocytów ulegało zmniejszeniu.

Na uwagę zasługuje fakt, że po raz pierwszy została wykazana małopłytkowość cykliczna u myszy z heterozygotyczną mutacją Mpl^{hlb219} .

Przeprowadzone badania wykazały, że w zależności od występowania mutacji Mpl^{hlb219} w układzie homozygotycznym czy też heterozygotycznym w megakariocytach dochodzi do różnic w ekspresji markerów powierzchniowych CD34 i CD61. Wskazuje to, że mutacja ma istotny wpływ na stopień dojrzałości megakariocytów. U homozygot oraz u heterozygot z małopłytkowością cykliczną w megakariocytach szpiku kostnego wykazano wyższy stopień ekspresji CD34 w porównaniu do grupy kontrolnej, natomiast zaobserwowano niższy stopień ekspresji CD61. Ekspresja CD34 i CD61 w megakariocytach szpiku kostnego u heterozygot z nadpłytkowością nie różniła się od grupy kontrolnej. Na podstawie uzyskanych wyników Autorka wyciąga wnioski, że zmiany ekspresji markerów CD34 i CD61 mogą świadczyć o większej dojrzałości megakariocytów szpiku kostnego w grupie heterozygot z nadpłytkowością niż u heterozygot z małopłytkowością cykliczną i homozygot z małopłytkowością. Zastosowane przez Autorkę modele mysie okazały się przydatnym narzędziem badawczym pozwalającym na lepsze zrozumienie mechanizmów megakariocytopoezy i trombopojezy.

Układ dysertacji obejmuje: 1.Wstęp (część teoretyczna), 2.Cele pracy, 3.Materiały i metody, 4.Wnioski, 5.Dyskusja, 6.Podsumowanie, 7.Streszczenie, 8.Summary, 9.Aneks, 10. Piśmiennictwo. Brak jest spisu rycin, tabel i fotografii. Tekst pracy obejmuje 95 stron. Zastrzeżenia budzi określenie części teoretycznej pracy „Wstępem”. Rozdział 2. – „Cele pracy” jest jednostronicowym opisem, który nie powinien stanowić odrębnego rozdziału, a znajdować się na początku dysertacji.

Praca napisana jest poprawnym naukowym językiem. Zakres literatury podanej przez Autorkę zawiera 149 pozycji literaturowych i odpowiada tematyce podjętych zagadnień. Dobór i wykorzystanie źródeł jest prawidłowe, natomiast brak najnowszych doniesień literaturowych. Na krytyczną uwagę zasługuje układ pozycji literaturowych oraz brak zastosowania w sposób spójny normy bibliograficznej stosowanej przy spisie literatury naukowej (np. układ alfabetyczny). Pojawiają się także liczne, lecz drobne błędy w edycji tekstu. W pracy także nie wszystkie stosowane skróty zostały umieszczone w wykazie używanych skrótów (np. TBO). Te drobne usterki nie wpływają na oczywiste walory poznawcze, jak i aplikacyjne rozprawy.

Rozprawa została napisana w sposób zwięzły, ale przejrzysty i jasny, a drobne uwagi redakcyjne jakich Autorka nie uniknęła, nie mają wpływu na całość pracy.

Podsumowując, uważam, że rozprawa lek. wet. K. Pyśniak wnosi bardzo dużo nowych, interesujących informacji dotyczących zaburzeń genetycznych związanych z procesem megakariocytopoezy i tworzeniem płytek krwi. Realizacja podjętych przez Autorkę zadań badawczych była możliwa dzięki zastosowaniu właściwego modelu zwierzęcego i niezwykle bogatego warsztatu badawczego. Uważam, że otrzymane wyniki powinny być przygotowane w najbliższym czasie do opublikowania w renomowanym czasopiśmie naukowym.

Stwierdzam, że oceniana praca doktorska pt „**Analiza wybranych parametrów procesu megakariocytopoezy u myszy z mutacją cMpl w pokoleniu F2 z krzyżówki (BALB/cW x C57BL/6J - Mpl^{hlb219}/J)**” spełnia wymagania stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień naukowy doktora.

Wnoszę zatem do Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie Państwowego Instytutu Badawczego w Warszawie o dopuszczenie lek. wet. Kazimierzy Pyśniak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Barbara Wachowicz