

Ocena rozprawy doktorskiej

"Analiza wybranych parametrów procesu megakariocytopoezy u myszy z mutacją c-Mpl w pokoleniu F2 z krzyżówki (BALB/cW x C57BL/6J-Mpl^{hlb219}/J)" autorstwa pani lek. wet. Kazimierzy Pyśniak

Praca doktorska pani Kazimierzy Pyśniak została wykonana pod kierunkiem pana prof. dr. hab. n. med. Jerzego Windygi, kierownika Zakładu Hemostazy i Chorób Metabolicznych Instytutu Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie.

Autorka poddała analizie wybrane parametry procesu megakariopoezy na materiale myszy z mutacją genu c-Mpl, który u ludzi koduje białko CD110 będące receptorem trombopoetynowym obecnym na subpopulacji krwiotwórczych komórek macierzystych. U myszy mutacje c-mpl (takie, jak wykorzystana w pracy mpl^{hlb219}) wpływają na efektywność procesu produkcji płytek krwi.

Rozprawa, zawarta na 92 stronach maszynopisu, przygotowana jest w klasycznym układzie i zawiera wstęp, opis celów pracy, wykorzystanych materiałów i metod, następnie przedstawiono wyniki i ich dyskusję, podsumowanie i wnioski.

Na początku pracy autorka umieściła przydatny wykaz używanych skrótów. Brakuje tu pewnej konsekwencji, tylko część użytych skrótów umieszczona została w wykazie, inne zostały objaśnione w tekście lub pozostawione bez objaśnienia. Nie jestem w stanie doszukać się logiki selekcji skrótów włączonych do wykazu, np. z ważnych dla pracy włączono MPL ale już nie c-MPL, z wymienionych jednym ciągiem i nie objaśnianych w tekście SCL, GATA1, GATA2, NF-E2 i ETS trzy skróty figurują w wykazie a dwa są pominięte. Interpretacja skrótu BFU-MK jako "jednostki, tworzącej ... wczesne kolonie megakariocytarne" jest błędne, BFU-MK powstaje wprawdzie z młodszych rozwojowo ("wcześniejszych") prekursorów linii megakariocytarnej, ale kolonie powstają później niż CFU-Mk (złożone z "późniejszych" prekursorów). Brzmi to skomplikowanie, ale dla doktorantki powinno być oczywiste.

Wstęp, zawarty na 18 stronach, stanowi zwięzły opis układu krwiotworzenia ze szczególnym uwzględnieniem megakariopoezy. Razi chaotyczne stosowanie mianownictwa, tym samym komórkom przypisywane są różne nazwy. Polski termin "pluripotencjalna komórka macierzysta" tłumaczony jest na angielski jako "hematopoietic stem cell" (co nie jest prawdą),

"krwiotwórcza komórka macierzysta" występuje w następnym zdaniu jako "hematopoetyczna komórka pnia" itp, ten chaos nazewnictwa musi być bezwarunkowo uporządkowany na etapie przygotowania pracy doktorskiej do publikacji. Opis megakariopoezy zawarty we wstępie dobrze odpowiada tematyce wykonanej pracy badawczej z jednym wyjątkiem: będącemu przedmiotem badań szczepowi myszy HLB219/J autorka poświęciła tylko jedno zdanie wstępu (str. 23), w dodatku bez cytowań literaturowych.

Celami pracy były:

- scharakteryzowanie związku mutacji Mpl^{hlb219} w genie receptora dla trombopoetyny c-Mpl z wystąpieniem zaburzeń liczby płytek krwi w modelu mysim (myszy pokolenia F2 krzyżówki BALB/cW x C57BL/6J-Mp^{hlb219}/J);
- określenie związku mutacji Mpl^{hlb219} w genie c-Mpl ze stężeniem TPO, EPO i IL-11 w surowicy krwi obwodowej oraz poszukiwanie zależności między stężeniem cytokin a liczbą megakariocytów w szpiku kostnym i liczbą płytek we krwi obwodowej badanych myszy;
- scharakteryzowanie wpływu mutacji w genie c-Mpl na stopień dojrzałości megakariocytów w szpiku kostnym.

Założenia badawcze ujęte w celach pracy uważam za prawidłowe, ich realizacja powinna dostarczyć danych przydatnych dla lepszego poznania wpływu defektów receptora trombopoetynowego na efektywność procesu megakariopoezy.

Rozdział "materiał i metody" zajmujący 14 stron dobrze dokumentuje dobór materiału (myszy C57BL/6J-Mp^{hlb219}/J) i metod badawczych. Na uznanie zasługuje warsztat, dostęp do kosztownego i trudnego w hodowli szczepu myszy pozwala wnioskować, że zwierzętarnia udostępniająca zwierzęta spełnia bardzo wysokie standardy jakościowe. Z uwag szczegółowych, niewłaściwy jest podział "materiału do badań" (str. 28) na krew obwodową, materiał tkankowy, kości udowe i śledziony. Zarówno krew, jak kości i śledziona stanowią także "materiał tkankowy" podobnie, jak określony tym terminem ogon myszy. Proponuję zrezygnować całkowicie z określenia "materiał tkankowy", bo nie jest to termin stricte naukowy i zastąpić go nazwą tkanki lub narządu, który posłużył jako materiał badany. Nie wszystkie opisy procedur spełniają kryterium możliwości ich powtórzenia w oparciu o przedstawioną metodykę, np. pkt. 3.2.5. "Badania immunohistochemiczne" sygnalizuje, że oceniano stopień dojrzałości megakariocytów w szpiku, ale z opisu nie wynika, co badano ("materiał przeznaczony do badań immunohistochemicznych umieszczany na szkiełkach podstawowych wygrzewano...") - w oparciu o tak nieprecyzyjny opis nie można powtórzyć

protokołu laboratoryjnego zastosowanego przez autorkę. Niejasnym kryterium oceny reakcji immunohistochemicznych jest ocena reakcji barwnej "w 100 kolejnych megakariocytach lub 10 polach widzenia" - wynika z tego, że albo badano 100 komórek albo tyle z nich, ile znaleziono w 10 polach widzenia?

Wyniki badań zaprezentowano na 23 stronach tekstu. Rozdział jest połączeniem opisów tekstowych, dokumentacji badań (zdjęć mikroskopowych, układów prążków elektroforezy) oraz rycin, tabel i wykresów wykonanych w oparciu o przeprowadzone analizy statystyczne i dobrze dokumentuje rezultaty części eksperymentalnej projektu. Z uwag szczegółowych - tytuł podrozdziału 4.3 "Wpływ mutacji Mpl^{hlb219} na genotyp myszy " jest dla mnie kompletnie niezrozumiały, tym bardziej, że podrozdział nie zawiera żadnych elementów rozwijających tezę zawartą w tytule.

Dyskusję zawarto na 11 stronach tekstu. Jest ona w dużej części powtórzeniem informacji zawartych we wstępie pracy i opisie uzyskanych wyników autorki a nie próbą tworzenia hipotez wynikających z nowo poczynionych obserwacji. Brakuje również szerszej konfrontacji wyników autorki z dotychczasową wiedzą wynikającą z prac innych autorów. Nie dyskwalifikuje to pracy doktorskiej, ale już w publikacji przygotowanej na jej podstawie konieczne będzie wyeksponowanie nowości wynikającej z badań i próby ich interpretacji rozszerzającej znajomość mechanizmów uczestniczących w procesie megakariopoezy.

Wnioski odpowiadają założonym celom pracy. Przeważająca ich część jest streszczeniem wyników, wskazane byłoby pozostawienie i ewentualne rozbudowanie tych fragmentów, które stanowią interpretację a nie streszczenie danych doświadczalnych. Proponuję też usunięcie z wniosków wątku dotyczącego niepublikowania wcześniej przez innych autorów zjawiska małopłytkowości cyklicznej u myszy z heterozygotyczną mutacją Mpl^{hlb219} i przeniesienia go do dyskusji.

Nie jestem w stanie ocenić doboru cytowanego piśmiennictwa, gdyż ostatnia pozycja cytowana w tekście ma numer kolejny 147 a całkowita liczba cytowań w dostarczonym mi egzemplarzu pracy wynosi 97 pozycji. Jest to niewątpliwie wina intrologatora, który prawdopodobnie "zgubił" kilka ostatnich stron tekstu, ale obowiązkiem doktorantki jest upewnienie się, żeby taka sytuacja nie miała miejsca. Niestarannością ze strony doktorantki jest pominięcie w tekście niektórych cytowanych pozycji literaturowych. Są one numerowane w kolejności cytowań, ale np. po pozycji [34] cytowana jest pozycja [36] (str. 12-14), pozycja [58] umieszczona jest w tekście (str. 16) między pozycją [41] a [42], na str 23 brakuje pozycji [99].

Praca wykonana przez doktorantkę wnosi nowe informacje, istotne zarówno w aspekcie badawczym jak klinicznym, problematyki zaburzeń wytwarzania i dojrzewania megakariocytów i defektów procesu trombopoëzy, wybrany do badań model zwierzęcy pozwala w dużym stopniu na transponowanie uzyskanych obserwacji na model ludzki.

Moje uwagi krytyczne nie zmieniają ogólnej wartości pracy, a komentowane niedociągnięcia (zwłaszcza natury edytorskiej) powinny być łatwe do usunięcia - najlepiej, gdyby to nastąpiło podczas publikacji pracy w dobrym czasopiśmie.

Przedstawiam Wysokiej Radzie wniosek o dopuszczenie doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z wyrazami szacunku,

Prof. dr hab. n. med. Zygmunt Pojda



Warszawa, 3 lutego 2021 r.