



WARSZAWSKI
UNIwersytet
MEDYCZNY

ZAKŁAD BIOLOGII I GENETYKI NOWOTWORÓW
KATEDRA PATOMORFOLOGII

Warszawa 30.10.2023

Prof. dr. n. med. Tomasz Stokłosa
Zakład Biologii i Genetyki Nowotworów
Katedra Patomorfologii
Warszawski Uniwersytet Medyczny
tomasz.stoklosa@wum.edu.pl

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Moniki Żukowskiej pod tytułem:
” Aging of hematopoietic stem cells: lessons learned from Hmox1 and Neo1
research”**

Przedstawiona mi do oceny rozprawa mgr Moniki Żukowskiej na stopień doktora nauk biologicznych dotyczy aktualnego i ważnego problemu - zjawiska starzenia się i odnowy macierzystych komórek krwiotworzenia (z ang. hematopoietic stem cells -HSC, w dalszej części recenzji będzie stosowany skrót ang). Jest to niezwykle interesujący temat zarówno z punktu widzenia badań podstawowych (modele układu krwiotwórczego) jak i ich znaczenia translacyjnego dla lepszego zrozumienia patogenezy chorób układu krwiotwórczego oraz opracowania nowych skutecznych terapii - zarówno komórkowych jak i celowanych.

Z uwagi na powyższe uważam, że wybór tematu rozprawy jest dobrze przemyślany, aktualny oraz trafia w najnowsze trendy w badaniach nad krwiotwórczymi komórkami macierzystymi i mechanizmami ich różnicowania i starzenia.

Rozprawa napisana jest w języku angielskim i liczy 118 stron (bez bibliografii, która obejmuje 246 pozycji na 22 stronach). Składa się ze streszczeń w języku polskim i angielskim, interesującego wstępu, wprowadzającego dobrze w temat, celu pracy (pewne zastrzeżenia poniżej), szczegółowego opisu materiałów i metod, obszernej sekcji wyników oraz wyczerpującej dyskusji. Bibliografia obejmuje aż 246 pozycji literaturowych, jest w mojej opinii nieco za obszerna ale na pewno wyczerpująca.

Pomimo tak dużej liczby pozycji jest poprawnie sformatowana, poza jednym wyjątkiem (*pozycja 238*). Oceniając całościowo rozprawę pod kątem technicznym i strukturalnym, praca jest napisana jasną i poprawną angielszczyzną, co należy uznać za wartość dodaną pracy i co niewątpliwie ma szansę pomóc Doktorantce w szybkim opublikowaniu oryginalnych wyników w uznanym czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym. Rozprawa jest także prawidłowo i starannie przygotowana jeśli chodzi o szatę graficzną, zawiera liczne ryciny oraz tabele (niektóre mylnie określane jako *figure*, czyli ryciny – np. Fig. 29 jest tabelą) a np. zdjęcia z immunofluorescencyjnymi barwieniami są nie tylko czytelne ale mają bardzo dobrą rozdzielczość. Drobną krytyczną uwagę odnoszącą się do strony językowej rozprawy, którą chciałbym podnieść, dotyczy nazewnictwa genów. Zgodnie z wytycznymi, ludzkie geny powinny być pisane wielką czcionką i kursywą, geny zwierzęce (w tym mysie) małą czcionką i kursywą analogicznie nazwy ludzkich i mysich białek wielką/małą czcionką. W większości przypadków Doktorantka stosuje prawidłowo tę regułę, ale ponieważ w pracy często występują naprzemiennie geny ludzkie i mysie to wkradły się pomyłki np. we wstępie (str.25, Tp53) czy w dyskusji (str. 100, Tet2, Dnmt3). Inna drobna uwaga semantyczna dotyczy tłumaczenia w polskim streszczeniu nazwy angielskiej „*hematopoietic stem cells HSCs*” jako „*hematopoetyczne komórki macierzyste*” wg opinii ekspertów hematologów, HSC powinno się tłumaczyć jako macierzyste komórki krwiotworzenia lub krwiotwórcze komórki macierzyste

W wyczerpującym tematykę **wstępie** przybliżona jest historia badań nad HSC. Doktorantka w ciekawy sposób przedstawia jak rozwijały się badania nad HSC, zarówno na modelach mysich jak i u człowieka, i jakie kolejne markery opisywano charakteryzujące macierzystość komórek krwiotwórczych. Co istotne, przedyskutowano we wstępie także te obszary wiedzy dotyczące HSC, które są wciąż przedmiotem kontrowersji i intensywnych badań, jak np. charakterystyka komórek HSC określanej jako tzw. „*side population*” a mającej zdolność wypompowywania barwników fluorescencyjnych. Ważną częścią wstępu jest opisanie podstawowych reguł rządzących cyklem komórkowym, jego faz co nabiera szczególnego znaczenia w aspekcie asymetrycznych podziałów HSC. Badania nad potencjalną heterogennością populacji HSC w aspekcie zdolności do proliferacji i wchodzenia w cykl komórkowy stanowiły jeden z celów pracy.

Celami pracy określanymi jako „lessons” było w ujęciu ogólnym poszukiwanie biomarkerów, które umożliwiłyby rozróżnienie heterogennych populacji starzejących się HSC w połączeniu z dokładnym zbadaniem zmian w cyklu komórkowym.

Zostały sprecyzowane dwa konkretne cele („lessons”), w pierwszym z nich Doktorantka postanowiła wykorzystać model myszy pozbawionych oksygenazy hemowej (HO-1) w całym organizmie (Hmox1^{-/-}), z którym zespół badawczy ma bardzo duże doświadczenie i liczne opublikowane wcześniej prace. Model ten został wykorzystany jako model przedwczesnego starzenia się HSC. Jako drugi cel określono poszukiwanie markera czy markerów, które pozwoliłyby odróżnić populacje LT-HSC (long-term HSC), w zakresie ich zdolności do różnicowania i różnic w mechanizmach starzenia.

Pewne zastrzeżenie budzi dla mnie bardzo ogólne sformułowanie celu czy lekcji nr 1. Powoduje to, iż w podsumowaniu jako osiągnięte cele pojawiają się informacje, które *de facto* były już wiadome przed rozpoczęciem badań zawartych w rozprawie. Dotyczy to badań nad oksygenazą hemową lokalizującą się w jądrze komórkowym (nuclear HO-1). Jak sama Doktorantka stwierdza w końcowym, wytłuszczonym akapicie wstępu (str. 38): „*Here, our aim was to investigate the role of the nuclear HO-1 in hematopoietic stem cells, especially in the regulation of their cell cycle.*” czyli badania od początku były ukierunkowane na rolę jądrowej postaci HO-1. W tej sytuacji jeśli było to już przyjęte jako założenie wstępne to trudno uznać to za jeden z osiągniętych celów pracy, a jako takie jest to wymienione w Summary (str. 118): „*HSCs have mainly a nuclear form of HO-1 protein*”.

Można także dyskutować, czy określenie celu pracy jako dwóch „lekcyj” (w domyśle „do odrobienia”) jest właściwe, ale nie jest to zarzut, a raczej niewielkie doświadczenie recenzenta w ocenianiu rozpraw doktorskich w języku angielskim. Istotne jest, że cele w zdecydowanej większości, zostały osiągnięte.

Materiały i metody są przedstawione w sposób bardzo dokładny i wyczerpujący, mam uwagę czy raczej wątpliwość dotyczącą metody zastosowanej do sekwencjonowania masowego i analizy ekspresji genów czyli RNAseq.

Wynika z niej, iż procedura NGS do analizy komórek z myszy Hmox1 różniła się od procedury dla analizy analogicznej analizy modelu Neo1. O ile liczba komórek musiała się różnić, jest to zrozumiałe, to nie wiem dlaczego sekwencjonowanie miało

inne parametry (w pierwszym przypadku odczyty były długości 75 par zasad, w drugim 151 bp)

Uwaga dotyczy opisu analizy statystycznej, szeroki wachlarz zastosowanych testów daje przekonanie, że zostały wybrane właściwie, jednak powinno być w metodyce wyraźnie określone do jakich eksperymentów i jakie testy.

Wyniki obejmują ponad 30 złożonych rycin i tabel i stanowią dowód na ogromny nakład pracy włożony przez Doktorantkę w przygotowanie rozprawy. Obejmują one zarówno badania *in vitro*, *in vivo* na modelach mysich jak również *ex vivo*. Zwracają uwagę szczegółowe analizy cytometryczne badanych populacji komórek wykonywane z najwyższą rozdzielczością a moje szczególne zainteresowanie wzbudziła analiza bioinformatyczna genów, których ekspresja jest charakterystyczna dla komórek HSC przy zastosowaniu technologii sortowania komórek pod kątem single-cell i następnie RNAseq. Jak jednak zrozumiałem z opisu metodyki, analiza ta została wykonana w części (w całości?) na Uniwersytecie Stanforda.

Dyskusja oparta jest o uzyskane wyniki, Doktorantka konfrontuje wyniki własne z danymi literaturowymi i wykazuje się właściwą znajomością dotychczas opublikowanych danych w zestawieniu z własnymi odkryciami. Zabrakło mi tylko szerszego przedyskutowania znaczenia odkrycia markera Neo1 jako różnicującego dwie różne populacje LT-HCS i odróżniającego te komórki, które są na samej górze w krwiotworzeniu. Mam nadzieję, iż w trakcie publicznej obrony Doktorantka będzie miała możliwość szerszego przedyskutowania tego odkrycia i znaczenia różnic w ekspresji białka neogeniny na subpopulacjach LT-HSC. Jest o niezwykle ciekawe również w kontekście niezwykle eksplorowanego w ostatnich latach zjawiska CHIP, czyli klonalnej hematopoezy o nieznanym potencjale, co porusza Doktorantka we wstępie.

Podsumowując, praca mgr Moniki Żukowskiej jest ważnym i nowatorskim wkładem w poznanie mechanizmów różnicowania i starzenia komórek macierzystych krwiotworzenia. Przeprowadzone badania mają dużą wartość poznawczą, a uzyskane wyniki stanowią oryginalny dorobek naukowy Doktorantki, a przedstawione przez mnie uwagi krytyczne można uznać za kategorię „minor”, trzymając się angielskiej nomenklatury i nie wpływają one znacząco na moją bardzo pozytywną ocenę rozprawy. Przedstawiona rozprawa spełnia warunki określone w artykule 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595; z późniejszymi zmianami) w związku z artykułem 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669 z późniejszymi zmianami) dlatego chciałbym przedstawić Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego wniosek o dopuszczenie Pani mgr **Moniki Żukowskiej** do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne oraz pragnę **wnioskować o wyróżnienie.**

KIEROWNIK
Zakład Biologii i Genetyki Nowotworów
prof. dr med. Tomasz Stokłosa

Tomasz Stokłosa