



UNIwersytet Gdański



Prof. dr hab. Grzegorz Węgrzyn
Katedra Biologii Molekularnej
Wydział Biologii
Uniwersytet Gdański
ul. Wita Stwosza 59
80-308 Gdańsk

Tel. (58) 523 6024 (Sekretariat)
Fax: (58) 523 6025 (Sekretariat)
Fax: (58) 523 5501 (Kierownik Katedry)
e-mail: joanna.bart@biol.ug.edu.pl (Sekretariat)
e-mail: grzegorz.wegrzyn@biol.ug.edu.pl (Kierownik Katedry)
www.biology.ug.edu.pl/kbm

Gdańsk, 6 kwietnia 2021 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej
Pani mgr Anny Deręgowskiej
pt. „Ocena kompleksu telomerowego jako potencjalnego czynnika
prognostycznego i/lub predykcyjnego w przewlekłej białaczce szpikowej”

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Anny Deręgowskiej dotyczy ważnego naukowo zagadnienia molekularnych mechanizmów procesu powstawania komórek nowotworowych, poszukiwania markerów prognostycznych chorób nowotworowych oraz poszukiwania zarówno nowych leków jak i czynników predykcyjnych w procesie leczenia. Jako model badawczy Doktorantka obrała przewlekłą białaczkę szpikową – jeden z najlepiej zbadanych nowotworów, którego molekularne mechanizmy wciąż jednak pozostają tylko częściowo wyjaśnione. W szczególności Pani mgr Anna Deręgowska skoncentrowała się na analizie kompleksu telomerowego w tym typie nowotworu. Postawiony cel naukowy należy zatem uznać za ważny, a jego realizację za odpowiadającą poziomowi pracy doktorskiej.

Rozprawa doktorska Pani mgr Anny Deręgowskiej ma postać tradycyjnego manuskryptu, obejmującego 162 strony druku, podzielonego na rozdziały tradycyjnie występujące w dysertacjach na stopnie naukowe z zakresu nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne, co oczywiście spełnia wymagania ustawowe. Na podkreślenie zasługuje bardzo dobrze napisane „Streszczenie” pracy, które jest bardzo ważnym elementem każdej pracy naukowej, a które precyzyjnie podkreśla najważniejsze osiągnięcia tej rozprawy i kluczowe wnioski.



Również bardzo wysoko oceniam rozdział pt. „Wstęp”, w którym Doktorantka przedstawiła aktualny stan wiedzy dotyczący przewlekłej białaczki szpikowej oraz budowy i funkcji telomerów, także w aspekcie zmian w tych strukturach spotykanych w komórkach nowotworowych. Do tego rozdziału mam tylko dwie uwagi. Po pierwsze, na str. 18 Doktorantka pisze, że produkt genu *BCR* jest białkiem o wielkości 120, 130 lub 160 kDa. Skąd pochodzą te rozbieżności w masie cząsteczkowej białka *BCR*? Baza danych GeneCards podaje masę tego białka równą 142,8 kDa. Proszę zatem o wyjaśnienie tych rozbieżności. Po drugie, na Ryc. 4 (str. 28) powinno być „struktura krystaliczna” zamiast „struktura krystalograficzna” – krystalografia to technika pozwalająca na ustalenie struktury krystalicznej badanego związku.

Opis używanych materiałów oraz stosowanych metod badawczych zasadniczo pozwala na szczegółowe prześledzenie wszystkich procedur badawczych. Trzeba przyznać, że zarówno zakres jak i liczba stosowanych przez Doktorantkę metod są godne uznania. Stosowane były bowiem zarówno metody biologii komórki, genetyki molekularnej jak i zaawansowanej biochemii. Pani mgr Anna Deręgowska ewidentnie dysponuje znajomością szerokiego wachlarza metod, co pozwala Jej na dogłębne zbadanie zagadnienia związanego z biologią nowotworów, a w przyszłości jakiegokolwiek zagadnienia z zakresu biologii molekularnej komórki.

Analizując linie komórkowe używane w pracy doktorskiej Pani mgr Anny Deręgowskiej nasunęły mi się dwa pytania. Po pierwsze, dlaczego liczba linii pochodzących od pacjentów chorych na przewlekłą białaczkę szpikową była drastycznie większa niż linii kontrolnych (78 vs. 4)? Rozumiem problemy z dostępnością materiału biologicznego pochodzącego od zdrowych wolontariuszy, niemniej jednak czy takie dysproporcje, zdaniem Doktorantki, nie zakłócają analizy statystycznej lub nie powodują mniejszej wiarygodności uzyskanych wyników? Po drugie, dlaczego w doświadczeniach z ustabilizowanymi liniami komórkowymi jako linii kontrolnej użyto komórek ostrej białaczki promielocytowej (HL-60) a nie komórek pochodzących od zdrowej osoby?

Opis metod jest zasadniczo precyzyjny, ale stwierdziłem istotny brak polegający na wymienianiu jedynie nazw buforów, bez podania ich składu. W większości przypadków są to bufony powszechnie znane, niemniej jednak wskazane byłoby wymienienie ich składów, co ułatwiłoby zarówno lekturę pracy jak i ewentualne powtórzenie opisanych doświadczeń.



Opis przeprowadzonych badań jest obszerny i ciekawie przedstawiony w rozdziale „Wyniki”. Doktorantka przeprowadziła kompleksowe badania zarówno na liniach komórkowych pochodzących od pacjentów jak też na znanych liniach będących modelami przewlekłej białaczki szpikowej. Liczba i jakość wykonanych testów są imponujące, a badane były zarówno same telomery i ich dynamika, ekspresja genów kodujących białka biorące udział w tworzeniu i obróbce telomerów, modyfikacje poszczególnych białek, tworzenie i efekty reaktywnych form tlenu, efektywność kluczowych etapów centralnego metabolizmu węgla, a wszystko to w komórkach nie poddawanych działaniu żadnych specyficznych substancji jak również po działaniu imatynibu – leku stosowanego w leczeniu badanego typu nowotworu. Najważniejszymi wnioskami wpływającymi z tych szeroko zakrojonych badań są następujące stwierdzenia, zaproponowane przez Doktorantkę: (1) zastosowanie imatynibu może istotnie wpływać na długość telomerów w komórkach przewlekłej białaczki szpikowej, (2) białka kompleksu telomerowego mogą mieć ważne znaczenie w utrzymaniu stabilności i długości telomerów oraz nabywaniu odporności na imatynib w tych komórkach, (3) długość telomerów koreluje z aktywnością metaboliczną tych komórek oraz aktywnością kinazy BCR/ABL1, (4) progresji choroby towarzyszy akumulacja produktów glikacji białek. Pani mgr Anna Deręgowska proponuje też, że inhibitory glikolizy mogą być w przyszłości rozpatrywane jako potencjalne leki wspomagające w przewlekłej białaczce szpikowej. Są to ważne wnioski i moim zdaniem wskazują, że Doktorantka przedstawiła rozwiązanie problemu naukowego, czym spełniła merytoryczne wymagania ustawowe dotyczące rozpraw doktorskich.

Przy tak obszernej rozprawie i tylu zaprezentowanych wynikach doświadczeń musiały się oczywiście pojawić pytania i wątpliwości. Zacznę od sprawy ogólnej, mianowicie interpretacji wyników. Uważam, że w rozdziale „Wyniki” często występuje nadinterpretacja rezultatów doświadczeń w postaci przedstawiania korelacji jako związków przyczynowo-skutkowych. Posłużę się jednym przykładem, ale w tekście jest ich wiele więcej. Na str. 80 czytamy, że „Skracanie telomerów w komórkach chorych z PBSz jest zależne od ekspresji *BCR/ABL1*”. Tym samym Doktorantka wskazuje, że ekspresja tego genu fuzyjnego wpływa bezpośrednio na skracanie telomerów. Na podstawie przedstawionych wyników nie można jednak wyciągnąć takiego wniosku, bowiem przedstawione zostały korelacje tych dwóch procesów, a nie związki przyczynowo-skutkowe – inaczej mówiąc, nie mamy żadnych dowodów na to, że przyczyną skracania telomerów jest ekspresja *BCR/ABL1*. Zalecana byłaby zatem większa ostrożność w wyciąganiu wniosków z wyników eksperymentów.



Jak wspomniałem, tego typu nadinterpretacji wyników spotykamy w ocenianej rozprawie relatywnie dużo. Co ciekawe, omówienie wyników na tle danych literaturowych przedstawione w rozdziale „Dyskusja” jest jak najbardziej prawidłowe. Korelacje pomiędzy różnymi mierzonymi wartościami są przedstawione właśnie jako takie, z prawidłową i wyważoną interpretacją. Zresztą rozdział ten uważam za napisany najbardziej dojrzałe z całej rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Deręgowskiej.

Powracając do opisu wyników, mam wątpliwości do części badań przedstawionych w rozdziałach 5.3.1. – 5.3.10. Jak Doktorantka wykazała, komórki linii HL-60 są odporne na imatynib. Jednakże w opisie wyników i na odpowiednich rycinach widoczne są doświadczenia przedstawiające „komórki odporne na imatynib wyselekcjonowane w długoterminowej hodowli w obecności imatynibu” i określane jako IM-R. O ile selekcja takich komórek w przypadku linii przewlekłej białaczki szpikowej jest oczywista, to proszę o wyjaśnienie, jaki układ eksperymentalny reprezentują w takim razie komórki linii HL-60 oznaczone jako IM-R? Dodatkowo, na str. 123 Doktorantka pisze, że w obecności imatynibu obserwowany był niższy poziom białka RAP1 w liniach niosących fuzyjny gen *BCR/ABL1*. Na Ryc. 34 widać jednak, że jest tak faktycznie tylko w przypadku linii K-562, ale nie w przypadku linii MEG-A2.

Muszę także zwrócić uwagę na używaną w pracy nomenklaturę genetyczno-biochemiczną. Mianowicie, określenia jak najbardziej poprawne przeplatają się z nieprawidłowymi sformułowaniami. Należy bowiem pamiętać, że ekspresji ulegają geny, a nie białka, które są produktami ekspresji genów. Można zatem mówić o poziomie ilości danego białka albo o efektywności ekspresji genu, ale sformułowanie „ekspresja białka” albo „ekspresja transkryptu” jest nieprawidłowe.

Przechodząc w ten sposób do oceny strony redakcyjnej pracy, stwierdzam, że jest ona napisana ogólnie poprawnym językiem naukowym i czytelnik nie ma problemów ze zrozumieniem założeń każdego doświadczenia, uzyskanych wyników oraz ich interpretacji. Zdarzają się jednak błędy literowe (np. str. 56 – jest „H₂0” czyli „ha-dwa-zero” zamiast „H₂O”), błędne zapisy wartości (w języku polskim ułamki dziesiętne zapisuje się z przecinkiem, a nie z kropką, np. str. 80 – jest „7.8” zamiast „7,8”, „5.8” zamiast „5,8”, „p=0.023” zamiast „p=0,023” itd.), nieprawidłowa numeracja niektórych podrozdziałów (np. jest 8.2.8.1 i 8.2.8.2. zamiast odpowiednio 5.2.8.1 i 5.2.8.2) czy używanie określenia „ilość” do rzeczowników policzalnych (zatem powinna być w takich przypadkach „liczba”, np. str. 91 – jest „ilość kopii genów”).



Chciałbym zwrócić szczególną uwagę na jeden powtarzający się błąd językowy, który można raczej uznać jako błąd logiczny, a który występuje nawet w tytule rozprawy doktorskiej. Chodzi o sformułowanie „i/lub”. W języku polskim określenie to nie ma żadnego logicznego sensu, natomiast pojawia się od pewnego czasu nagminnie i to nie tylko w nieformalnych tekstach lecz także w oficjalnych publikacjach czy dokumentach. Czując się w obowiązku piętnować tego typu nielogiczne określenia, szczególnie w języku naukowym, który powinien cechować się precyzyjnością określeń i logiką, uważam za konieczne omówienie nieprawidłowości stosowania określenia „i/lub”. Mianowicie, koniunkcja „i” oznacza konieczność spełnienia obu z podanych w zdaniu warunków, zaś alternatywa nierozłączna „lub” oznacza, że może być spełniony jeden warunek bądź oba. Zatem określenie „i/lub” nie ma sensu, gdyż „i” zawiera się już w „lub”. Można by co prawda użyć określenia „i/albo”, czyli połączenia koniunkcji i alternatywy rozłącznej (tzn. spełnienia jednego i tylko jednego z dwóch warunków), ale nie ma takiej potrzeby, gdyż „i/albo” oznacza dokładnie to samo co „lub”. Prawdopodobnie określenie „i/lub” wzięło się bezpośrednio z prostego, ale błędnego, tłumaczenia z języka angielskiego zwrotu „and/or”. Problem w tym, że w języku angielskim nie ma odpowiednika słowa „lub”. Słowo „and” jest odpowiednikiem „i”, zaś słowo „or” jest odpowiednikiem „albo”. Zatem aby po angielsku powiedzieć „lub” trzeba użyć określenia „and/or”, natomiast nie ma takiej konieczności w języku polskim, gdyż istnieje słowo „lub”.

W podsumowaniu uważam, że Pani mgr Anna Deręgowska wykazała się wiedzą teoretyczną z zakresu prowadzonych przez siebie badań, co udowodniła przedstawiając bardzo dobrze napisany rozdział „Wstęp” w rozprawie doktorskiej. Udowodniła także, że potrafi rozwiązać problem naukowy poprzez odpowiednie zaplanowanie badań, wykonanie doświadczeń oraz wyciągnięcie wniosków. Uzyskała istotne naukowo rezultaty doświadczeń, poprawnie je opisała i mimo pewnej nadinterpretacji zawartej w rozdziale „Wyniki”, ostatecznie zaprezentowała uprawnione wnioski. Dojrzałość naukową zaprezentowała pisząc znakomicie rozdział „Dyskusja”. Stwierdzam zatem, że spełnione zostały wymagania ustawowe dotyczące warunków jakie musi spełniać rozprawa doktorska. W związku z powyższym, wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o dopuszczenie Pani mgr Anny Deręgowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.