



UNIwersytet Medyczny
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU

**Katedra i Klinika Hematologii, Terapii Komórkowych i Chorób
Wewnętrznych**

ul. Pasteura 4, 50-367 Wrocław

Tel.: 71.784.25.76

Wrocław, dnia 20.2.2025

Ocena rozprawy doktorskiej lek. Małgorzaty Gajewskiej
**„Zastosowanie oceny stref organizatorów jąderkotwórczych (AgNOR, ang. argyrophilic
nucleolar organizer region) w ostrych białaczkach”**

Niniejsza ocena została sporządzona na zlecenie Rady Naukowej Wojskowego Instytutu Medycznego – Państwowego Instytutu Badawczego. Lek. Małgorzata Gajewska, zwana dalej Doktorantką, ubiega się o stopień naukowy doktora na podstawie rozprawy p.t. **„Zastosowanie oceny stref organizatorów jąderkotwórczych (AgNOR, ang. argyrophilic nucleolar organizer region) w ostrych białaczkach”**

Oceniana rozprawa została przygotowana na podstawie zbioru trzech oryginalnych powiązanych tematycznie artykułów w recenzowanych czasopismach naukowych ujętych w wykazie ministerialnym:

- Gajewska M, Rutkowska E., Kwiecień I, Rzepecki P, Sułek K. Analysis of argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) in acute leukemias in adults. *Diagnostics* 2022; 12(4), 832.
- Gajewska M, Rutkowska E., Kwiecień I, Rzepecki P, Sułek K. AgNOR pattern and configuration in adult acute leukemias patients. *Centr Eur J Immunol* 2022; 47(4): 323-331.

- Gajewska M, Rutkowska E., Kwiecień I, Rzepecki P, Sułek K. Can AgNORs counts and configuration predict complete remission in adult myelogenous leukemia patients? Lek. Wojsk. 2022; 100(3), 177-180.

Oceniana rozprawa składa się z dwóch części. Pierwsza z nich zawiera szczegółowe przedstawienie wyników badań opublikowanych w powyższych artykułach, poprzedzone wstępem, przedstawieniem celów rozprawy, materiałów i metodyki. Po przedstawieniu wyników następuje ich omówienie i wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz spis piśmiennictwa. Ta część pracy odpowiada swoją konstrukcją typowej rozprawie doktorskiej w jej tradycyjnym rozumieniu. Druga część rozprawy, określoną jako załączniki, stanowią kopie wyżej wymienionych trzech artykułów.

Regiony organizujące jąderko (nucleolar organizer regions, NORs) są regionami chromosomowymi kluczowymi dla formowania się jąderek, zawierającymi m.in. elementy kodujące dla rybosomalnego RNA (rRNA). Jąderka z kolei są miejscem syntezy podjednostek rybosomów, uczestniczących w syntezie łańcuchów polipeptydowych w procesie translacji. Najprostszym sposobem uwidocznienia NORs jest ich wybarwienie azotanem srebra (AgNORs), co pozwala na ich analizę mikroskopową. Ze względu na fundamentalne znaczenie NORs dla całokształtu procesów życiowych komórki i jej aktywności podziałowej, były one przedmiotem badań w patologii nowotworowej, wykazujących ich zaburzenia ilościowe i jakościowe oraz znaczenie rokownicze w niektórych guzach litych i chorobach onkohematologicznych. Znaczenie zaburzeń NORs w ostrych białaczkach jest jednak słabo poznane, dlatego też tematyka badań zrealizowanych przez Doktorantkę nosi znamiona nowatorstwa.

W krótkim, pięciostronicowym wstępie Doktorantka przedstawia podstawowe dane na temat NORs i ich budowy oraz metod ich wizualizacji. Następnie dokonuje przeglądu piśmiennictwa na temat zaburzeń tych struktur w patologiach nowotworowych, ze szczególnym uwzględnieniem chorób onkohematologicznych. Rozdział kończy uzasadnienie podjęcia badań własnych, jakim jest brak publikacji na omawiany temat po roku 2004.

Cele rozprawy zostały ujęte w trzech punktach jako analiza struktur AgNORs w ostrych białaczkach osób dorosłych, jak również ich ocena wartości diagnostycznej oraz rokowniczej. Tak sformułowane cele są uzasadnione w świetle przedstawionych uprzednio danych piśmiennictwa światowego.

Materiałem do badań były komórki szpiku kostnego dorosłych chorych na ostre białaczki. Do pracy „Analysis of argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) in acute leukemias in adults” i „AgNOR pattern and configuration in adult acute leukemias patients”

Doktorantka wykorzystała komórki 45 chorych na ostrą białaczkę szpikową (AML) i 25 chorych na ostrą białaczkę limfoblastyczną (ALL), natomiast do publikacji „Can AgNORs counts and configuration predict complete remission in adult myelogenous leukemia patients?” – 24 pacjentów z ostrą białaczką szpikową. AgNORs i ich parametry morfometryczne w komórkach blastycznych były oceniane w mikroskopie świetlnym po wybarwieniu azotanem srebra, co jest klasyczną i ogólnie przyjętą metodą ich badań. Analizie poddawano liczbę AgNOR, ich powierzchnię, stosunek ich powierzchni do powierzchni jądra komórkowego oraz konfigurację ich rozkładu przestrzennego ocenianą na podstawie różnorodności ich powierzchni i kształtu.

Doktorantka wykazała, że wszystkie podstawowe wskaźniki AgNORs (liczba, średnia powierzchnia i średni stosunek ich powierzchni do powierzchni jądra) były wyższe w AML niż w ALL. U chorych na AML średnia powierzchnia AgNORs w grupie cytogenetycznej ELN3 była wyższa niż w grupie ELN2. Ponadto ich liczba w pacjentów z $WBC > 12$ G/l lub z $>20\%$ blastów we krwi obwodowej była wyższa w stosunku do chorych odpowiednio z $WBC \leq 12$ G/l lub z $\leq 20\%$ blastów. W grupie ALL Doktorantka wykazała natomiast wyższy średni stosunek powierzchni AgNORs do powierzchni jądra u chorych z chromosomem Philadelphia. Badanie konfiguracji rozkładu AgNOR pozwoliło wykazać istotne różnice w tym zakresie pomiędzy AML i ALL. W obrębie AML była ona zróżnicowana w zależności od grupy ryzyka cytogenetycznego, natomiast w grupie ALL w zależności od przynależności liniowej blastów (B lub T). Badania, będące przedmiotem ostatniej publikacji wchodzącej w skład cyklu, które objęły 24 chorych na AML, wykazały wyższy średni stosunek powierzchni AgNORs do powierzchni jądra komórkowego u pacjentów, którzy uzyskali całkowitą remisję po leczeniu indukcyjnym.

Wszystkie te wyniki zostały bardzo szczegółowo przedstawione w rozdziale 4 w formie opisowej, tabelarycznej i graficznej. Z obowiązku recenzenta pragnę tu jednak zwrócić uwagę na zbyt lakoniczne legendy tabel i rycin, co utrudnia korzystanie z nich. Ogólna zasada jest taka, że zrozumienie ich treści powinno być możliwe bez konieczności poszukiwania odpowiednich informacji w tekście pracy, a w szczególności w ich legendzie powinny być wyjaśnione wszystkie zastosowane skróty (poza tak oczywistymi, jak Hgb, WBC, PLT itp.). Właściwe opisanie tabel i wykresów jest szczególnie istotne w ocenianej rozprawie, gdyż Doktorantka podaje analizowane wskaźniki bądź w przeliczeniu na jedną komórkę, bądź jako suma wartości w całej analizowanej populacji komórkowej, a to powinno być wyraźnie i w niebudzący wątpliwości sposób napisane w legendzie. I tak na przykład czytelnik musi się domyślać, że wartości we wierszach tabel 24, 28-35, 38-42 odpowiadają liczbie komórek

spośród dwustu przeanalizowanych, wykazujących daną strukturę lub konfigurację AgNORs, podczas gdy w inne tabele przedstawiają średnie wartości badanych parametrów w jednej komórce. Doktorantka posługuje się też skrótami myślowymi dotyczącymi stosowanych narzędzi statystycznych. W wielu miejscach podaje wartość średnią i wartość mediany średniej nie pisząc, czym oba te wskaźniki się różnią i o czym informują. Doktorantka również wielokrotnie operuje parametrem określanym jako wartości kwartyli (np. str. 40) – których kwartyli? Dla każdej populacji jest ich bowiem cztery. Uważam też za zbyteczne charakteryzowanie cech AgNORs w AML w zależności od podtypu FAB (notabene systemu klasyfikacyjnego obecnie już nie używanego) i w ALL w zależności od przynależności liniowej T lub B. Bardzo mała liczebność niektórych wyodrębnionych podgrup (5 chorych z M0, 3 chorych z M5, 4 chorych z ALL-T) nie pozwala na wnioskowanie statystyczne, a wprowadzenie takich podziałów jedynie komplikuje prezentację wyników

W rozdziale Omówienie wyników i dyskusja Doktorantka omawia wyniki uzyskanych badań, odnosząc je kolejno do trzech publikacji, w których zostały one zamieszczone. Doktorantka sytuuje je w kontekście badań wcześniej już opublikowanych, wykazując tym samym dobrą orientację w piśmiennictwie dotyczącym tematyki, będącej przedmiotem Jej pracy, co pokazała już wcześniej w rozdziale Wstęp. W omówieniu znaczenia NORs i zastosowania oznaczeń AgNORs zabrakło mi wzmianki, że ten wskaźnik był traktowany jako wskaźnik aktywności podziałowej komórek. Doktorantka nie miała możliwości wykazania tego w przeprowadzonych badaniach, gdyż nie analizowała aktywności proliferacyjnej blastów metodami bezpośrednimi, jak np. cytometryczne oznaczenie zawartości DNA w badanych populacjach komórkowych, co nie wchodzi w zakres rutynowej diagnostyki wstępnej ostrych białaczek. Omówienie danych piśmiennictwa dotyczących związku pomiędzy liczbą AgNORs a aktywnością proliferacyjną blastów niewątpliwie wzbogaciłoby dyskusję.

W rozdziale 6 Doktorantka formułuje trzy wnioski, które mają pokrycie w uzyskanych wynikach badań. Złagodziłbym jednak wniosek 1, gdyż mamy obecnie do dyspozycji znacznie czulsze i bardziej specyficzne narzędzia pozwalające na określenie przynależności liniowej komórek blastycznych ostrych białaczek. Nie sposób natomiast nie zgodzić się z wnioskami drugim i trzecim, ale poprzestanie na stwierdzeniu, czego nie wykazano, może pozostawić czytelnika w przeświadczeniu, że tak naprawdę Doktorantce niewiele udało się uzyskać. Lektura pracy doprowadziła mnie natomiast do przekonania, że chociaż przedstawione wyniki faktycznie nie dają nie budzących wątpliwości podstaw do wnioskowania o wartości rokowniczej analizowanych parametrów, to jednak te badania są

warte kontynuacji na większych grupach pacjentów w celu oceny, czy analiza ilości i morfologii AgNORs w blastach ostrych białaczek nie wzbogaciłaby istniejących systemów prognostycznych tych chorób, zwłaszcza że taka analiza może być wykonana nakładem niewielkich kosztów w każdym laboratorium. Gorąco zachęcałbym więc Doktorantkę do bardziej optymistycznego spojrzenia na wyniki badań własnych przez pryzmat perspektyw, jakie one otwierają.

Powyższe uwagi mają charakter redakcyjny dotyczący nie publikacji, które są istotą rozprawy doktorskiej, a ich omówienia. Nie mam natomiast zastrzeżeń merytorycznych do ocenianej pracy, a o jej wysokiej wartości świadczy fakt opublikowania jej wyników w trzech artykułach w recenzowanych czasopismach, w tym dwóch ze współczynnikiem wpływu. Wiodący wkład Doktorantki w ich powstanie jest dla mnie oczywisty. Również nowatorstwo badań nie budzi wątpliwości. Realizując badania Doktorantka wykazała się solidną wiedzą w zakresie medycyny klinicznej i niezbędnych zagadnień biologii komórkowej. Doktorantka udowodniła też dojrzałość naukową, umiejętność korzystania z piśmiennictwa naukowego, planowania i realizacji badań w dziedzinie nauk medycznych oraz poprawnej interpretacji ich wyników.

W podsumowaniu stwierdzam, że oceniana rozprawa doktorska, będąca zbiorem opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych, prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Kandydatki w dyscyplinie oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, a jej przedmiotem jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Tym samym spełnia ona wszystkie określone w art. 187 ust. 1-3 wymogi stawiane przez Ustawę z dnia 20.7.2018 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce rozprawom na stopień naukowy doktora (Dz.U. z 2023, poz. 742). **Mam więc zaszczyt i przyjemność wnioskować do wysokiej Rady Naukowej Wojskowego Instytutu Medycznego – Państwowego Instytutu Badawczego o dopuszczenie Pani lek. Małgorzaty Gajewskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora.**

Prof. dr hab. Dariusz Wołowicz