



Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej  
im. Mirosława Mossakowskiego  
Polskiej Akademii Nauk

Warszawa, 6 grudnia 2023

dr hab. n. med. Monika Szeliga  
Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej  
im. M. Mossakowskiego PAN  
Zakład Neurotoksykologii  
ul. Pawińskiego 5  
02-106 Warszawa  
e-mail: mszeliga@imdik.pan.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej pana mgr. Salvadora Cyranowskiego  
pt. *„The role of chitinase-3-like protein 1 in the pathobiology of gliomas”*  
wykonanej pod kierunkiem pani prof. dr hab. Bożeny Kamińskiej – Kaczmarek  
w Studium Medycyny Molekularnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego,  
Pracowni Neurobiologii Molekularnej Instytutu Biologii Doświadczalnej  
im. M. Nenckiego PAN

Glejaki są najczęstszymi złośliwymi nowotworami ośrodkowego układu nerwowego, charakteryzującymi się agresywnym przebiegiem klinicznym i złymi rokowaniami. Glioblastoma jest glejakiem o najwyższym, czwartym stopniu złośliwości wg klasyfikacji Światowej Organizacji Zdrowia (World Health Organization, WHO). Średni czas przeżycia pacjentów z glioblastoma wynosi ok. 12-15 miesięcy. Istotnym elementem wpływającym na tak złe rokowania jest wysoka heterogenność zarówno samych glejaków, jak i ich mikrośrodowiska. Tematyka przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej doskonale wpisuje się w ważny nurt badań, których celem jest poznanie molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za patogenezę glejaków.

Dysertacja pana mgr. Cyranowskiego została napisana w języku angielskim, co zapewne zwiększa zasięg przekazu przedstawionych w niej wyników. Rozprawa ma klasyczny układ, liczy 91 stron i składa się ze zwyczajowo przyjętych rozdziałów zasadniczych, a także sekcji pomocniczych, takich jak spis treści, wykaz skrótów, streszczenia w języku polskim i angielskim, spis piśmiennictwa oraz informację o zgodzie Lokalnej Komisji Etycznej. Piśmiennictwo obejmuje 167 pozycji, których jakość i zakres wskazują na bardzo dobre przygotowanie Doktoranta do podjętego tematu badawczego.

W pierwszej części wstępu Autor przedstawił informacje na temat białka CHI3L1 oraz znaczenie zaburzonej ekspresji kodującego go genu w patogenezie nowotworów. Dalszą część wstępu Doktorant poświęcił glejakom, prezentując zwięźle ich epidemiologię i klasyfikację oraz bardziej szczegółowo obecny stan wiedzy na temat biologii tych nowotworów, z uwzględnieniem roli mikrośrodowiska. Zwięźleniem tej części dysertacji jest przedstawienie aktualnych danych literaturowych dotyczących funkcji białka CHI3L1 w glioblastoma. Wstęp jest przemyślany i stanowi dobre wprowadzenie do problematyki badawczej rozprawy.

W oparciu o przedstawiony we wstępie stan wiedzy Doktorant sformułował cel swoich badań, czyli dogłębną analizę ekspresji genu *CHI3L1* w glejakach oraz ocenę roli kodowanego przez ten gen białka w patogenezie glioblastoma. Zakres planowanych badań został precyzyjnie określony w pięciu celach szczegółowych.

Rozdział przedstawiający metodologię zawiera szczegółowy i przejrzysty opis zastosowanych modeli i technik badawczych, wsparty rycinami ilustrującymi przebieg doświadczeń lub sposób analizy danych. Doktorant wykorzystał zarówno materiał kliniczny pobrany od pacjentów z glejakami o różnym stopniu złośliwości, informacje zawarte w publicznie dostępnych bazach danych, jak i komercyjnie dostępne linie komórkowe i hodowle komórkowe wyprowadzone z tkanek glioblastoma. Mgr Cyranowski zastosował szeroki wachlarz technik molekularnych i komórkowych obecnie standardowo używanych w badaniach *in vitro*, a także nowoczesną technikę sekwencjonowania transkryptomu wraz z analizą bioinformatyczną otrzymanych danych. Ponadto Doktorant przeprowadził część eksperymentów na mysim modelu glioblastoma wykorzystując śródczaszkową implantację ludzkich komórek linii U87MG oraz późniejsze obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego i immunofluorescencyjne barwienie tkanek.

Uzyskane wyniki zostały bardzo klarownie opisane i udokumentowane na 26 rycinach opatrzonych wyczerpującymi legendami. Dodatkowo Autor zamieścił schemat ilustrujący proces konstrukcji komórek linii U87MG z nokautem genu *CHI3L1*. Należy podkreślić, że opis wyników uzyskanych w kolejnych eksperymentach jest poprzedzony bardzo krótkim uzasadnieniem podjęcia badań, a zakończony interpretacją uzyskanych danych, co ułatwia lekturę tej części rozprawy. Otrzymane wyniki jasno wskazują, że w porównaniu do nienowotworowych tkanek mózgu gwiazdki włosowatokomórkowe (WHO I) i glioblastoma (WHO IV) charakteryzują się znacznie podwyższoną ekspresją genu *CHI3L1*. Analiza ekspresji genu *CHI3L1* w ludzkich astrocytach i panelu linii komórkowych glioblastoma oraz pomiar stężenia białka CHI3L1 wydzielanego przez te komórki doprowadził Autora do konkluzji, że najlepszym modelem do dalszych badań będzie linia U87MG. Spośród szerokiej

kolekcji uzyskanych klonów Doktorant wybrał dwa (KO1 i KO2) charakteryzujące się najniższą ekspresją *CHI3L1* i jednocześnie najniższym stężeniem wydzielanego białka *CHI3L1*. Wyciszenie *CHI3L1* nie wpłynęło na proliferację komórek, natomiast obniżyło ich inwazyjność oraz zmieniło profil ekspresji licznych genów, z których duża część koduje białka związane z organizacją macierzy zewnątrzkomórkowej oraz szlakiem sygnałowym PD-1. Ponadto, wyciszenie *CHI3L1* obniżyło potencjał komórek do formowania nowotworów w modelu *in vivo*, zmniejszyło nacieki mieloidalnych komórek odpornościowych, a także spowodowało normalizację unaczynienia guzów.

W kolejnym rozdziale dysertacji mgr Cyranowski analizuje otrzymane wyniki w kontekście aktualnego stanu wiedzy w danej dziedzinie. Dyskusja jest zwięzła i poprowadzona logicznie, a sposób posługiwania się danymi literaturowymi wskazuje na dojrzałość Doktoranta. Zwieńczeniem rozprawy jest bardzo syntetyczne podsumowanie wraz z trafnie sformułowanymi czterema wnioskami.

Podczas czytania dysertacji nasunęły mi się następujące pytania:

1. W porównaniu do nienowotworowych tkanek mózgu, ekspresja *CHI3L1* jest podwyższona w gwiaździakach włosowatokomórkowych (WHO I) i glioblastoma (WHO IV), ale nie jest zmieniona w gwiaździakach rozlanych. Jaka może być przyczyna tego zjawiska?
2. Jaki mechanizm może odpowiadać za podwyższoną ekspresję *CHI3L1* w glioblastoma?
3. Z czego może wynikać różnica w ekspresji niektórych genów (np. *BMP1*, *GDF5*, *PCOLCE*) między klonami *CHI3L1* KO1 i KO2?
4. Pomimo obniżonej ekspresji kilku genów związanych z replikacją DNA (*PCNA*, *NUP62*, *SUMO3*), komórki z wyciszoną ekspresją *CHI3L1* nie wykazują niższego tempa proliferacji w porównaniu do komórek dzikich. Z czego zatem może wynikać wolniejszy wzrost formowanych przez nie nowotworów w układzie *in vivo*?
5. Jaki mechanizm może odpowiadać za zmiany profilu ekspresji genów w komórkach z wyciszoną ekspresją *CHI3L1*?

Z obowiązku recenzenta poniżej przedstawiam drobne niedociągnięcia, jednak ponieważ dotyczą one głównie warstwy edytorskiej, nie ma potrzeby, aby Doktorant odnosił się do nich w trakcie obrony:

1. We wstępie Autor umieścił pięć rycin odnoszących się do poruszanej tematyki, przy czym cztery z nich są skopiowane z opublikowanych już prac innych autorów.

Określenie w legendach „adapted from...” sugeruje, że Doktorant wprowadził jednak jakieś modyfikacje w tych rycinach, tymczasem nie zostały one w żaden sposób zmienione względem oryginałów. Ponadto, legenda do ryciny 1.1 jest okrojona i może sugerować, że czytelnik powinien zwrócić szczególną uwagę na cztery białka (CRTH2, FAK, NFκB, RAGE), choć to raczej nie było intencją Doktoranta.

2. Dysertacja napisana jest poprawnym językiem, jednak zdarzają się niefortunne sformułowania – za takie uważam na przykład „komórkowe źródło ekspresji *CHI3L1* w glejakach” („the cellular source of *CHI3L1* expression in gliomas”) zastosowane w odniesieniu do typu komórek, w których gen *CHI3L1* ulega ekspresji.
3. Nazwy genów powinny być zawsze pisane kursywą, a po pierwszym zastosowaniu skrótu GBM w odniesieniu do glioblastoma warto było stosować go konsekwentnie w całym tekście.

Podsumowując ocenę dysertacji mgr. Salvadora Cyranowskiego pragnę podkreślić, że prezentuje ona wysoki poziom merytoryczny. Doktorant podjął aktualny i istotny temat badawczy, a uzyskane wyniki niewątpliwie poszerzają wiedzę na temat roli *CHI3L1* w patogenezie glioblastoma. Zarówno sposób przedstawienia wyników, jak i ich dyskusja wskazują na dojrzałość naukową Autora.

Stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr. Salvadora Cyranowskiego pt. „*The role of chitinase-3-like protein 1 in the pathobiology of gliomas*” spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668)” i wnioskuję do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr. Salvadora Cyranowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, ze względu na różnorodność i nowoczesność zastosowanych technik badawczych oraz wysoki poziom merytoryczny prezentowanych wyników, wnioskuję o wyróżnienie w/w rozprawy doktorskiej.

dr hab. n. med. Monika Szeliga