Akceptuję

Prof. dr hab. med. Radosław Rola
Katedra i Klinika Neurochirurgii
i Neurochirurgii Dziecięcej
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

RECENZJA

rozprawy doktorskiej magistra Salwadora Cyranowskiego
pt. „**The role of chitinase-3-like protein 1 in the pathobiology of gliomas** "
przygotowanej pod kierunkiem
prof. dr hab. Bożeny Kamińskiej-Kaczmarek
w Pracowni Neurobiologii Molekularnej, Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego Polskiej Akademii Nauk w Warszawie
oraz Studium Medycyny Molekularnej Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Złośliwe nowotwory glejowe ośrodkowego układu nerwowego stanowią jedno z największych wyzwań dla współczesnej neuroonkologii. Pomimo wyraźnego postępu w technikach operacyjnych umożliwiających uzyskanie rozległych resekcji z niewielkim ryzykiem niekorzystnych następstw neurologicznych oraz wdrożenia zaawansowanych protokołów leczenia wspomagającego z zastosowaniem radiochemioterapii jak dotychczas nie osiągnięto istotnej poprawy całkowitej przeżywalności pacjentów cierpiących na te schorzenia. Z tej perspektywy szczególnie ważnym wydaje się fakt, że nowotwory te charakteryzują się wysoką heterogennością znajdującą odzwierciedlenie w dużym potencjale proliferacyjnym i migracyjnym komórek nowotworowych co prawdopodobnie leży u podstaw ich dużej oporności na konwencjonalne strategie terapeutyczne. W tym kontekście istotnego znaczenia nabierają projekty badawcze zorientowane na scharakteryzowanie złożonych mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za zmienność komórek złośliwych guzów glejopochodnych będącą jednym z kluczowych czynników odpowiedzialnych za niską skuteczność dotychczas stosowanych schematów leczniczych i stworzenie podstaw teoretycznych dla nowych, personalizowanych strategii terapeutycznych

dających nadzieję na poprawę wyników leczenia tych, stanowiących wciąż olbrzymie wyzwanie dla współczesnej medycyny, guzów. W powyższy nurt znakomicie wpisuje się praca doktorska magistra Salwadora Cyranowskiego, która w sposób kompleksowy analizuje rolę jaką pełni chitinase-3-like protein 1 (CHI3L1) w patobiologii guzów glejopochodnych.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska zawiera 91 stron tekstu, 37 rycin i 1 tabelę podzielonych na rozdziały typowe dla dysertacji doktorskiej. W opinii Recenzenta korzystnym byłoby jednak uzupełnienie jej o spis rycin, które ze względu na znaczenie przedstawionych graficznie danych stanowią kluczowy element dysertacji, nawigowanie której ze spisem rycin byłoby łatwiejsze i bardziej intuicyjne. Pewne zastrzeżenia budzi również oprawa edytorska pracy, w rozdziale Piśmiennictwo wydaje się, że Autor nie przyjął jednej obowiązującej konwencji formatowania pozycji piśmiennictwa – pierwsze 2 pozycje przytaczają 5 autorów i 2 autorów po czym już w pozycji 4 czy 6 pojawia się 1 autor z dopiskiem et al. co wprowadza chaos. Wydaje się, że korzystnym byłoby wprowadzenie standardowej konwencji – pierwszych 3 autorów dodając potem et al. Powyższe uwagi nie umniejszają jednak w istotny sposób ogólnego wrażenia należytego przygotowania pracy doktorskiej.

We Wstępie, uporządkowanym w logicznie uszeregowane podrozdziały Doktorant sukcesywnie charakteryzuje funkcje pełnione przez CHI3L1 zarówno w warunkach fizjologicznych jak i w przypadku różnych patologii obejmujących procesy zapalne, schorzenia ośrodkowego układu nerwowego jak i choroby nowotworowe. W tym podrozdziale na szczególne podkreślenie zasługuje fakt przygotowania ryciny ilustrującej interakcje CHI3L1 z wybranymi ligandami białkowymi i ich szlakami sygnałowymi co w znacznym stopniu ułatwia zrozumienie skomplikowanych interakcji, w które wchodzi CHI3L1 w zakresie inicjacji i progresji schorzeń nowotworowych. Kolejny podrozdział poświęcony jest glejakowi wielopostaciowemu i uwzględnia epidemiologię i aktualnie obowiązującą klasyfikację nowotworów glejopochodnych oraz w interesujący sposób przedstawia kluczowe cechy złośliwych guzów glejopochodnych determinujące ich przebieg kliniczny takie jak zdolność do naciekania miąższu mózgu, mikrośrodowisko guza i związany z nim proces naciekania guza przez komórki immunokompetentne oraz proces przebudowy sieci naczyniowej w obrębie guza związany z nowotworzeniem naczyń. Podsumowaniem wstępu jest podrozdział poświęcony dotychczasowej wiedzy na temat roli CHI3L1 w patobiologii glejaka wielopostaciowego który w sposób zwięzły buduje podstawy teoretyczne dla

sformułowania celu badań w rozdziale 2. W nim to Doktorant formułuje hipotezę badawczą jaką jest precyzyjny opis profilów ekspresji CHI3L1 w guzach glejopochodnych oraz roli jaką odgrywa CHI3L1 w progresji glejaka wielopostaciowego z uwzględnieniem mechanizmów odpowiedzialnych za ten proces. W tym celu Doktorant definiuje cele szczegółowe obejmujące: identyfikację komórkowych źródeł CHI3L1 w oparciu o analizę *in silico* danych dostępnych w publicznych repozytoriach, stworzenie genetycznie zmodyfikowanej linii komórkowej glejaka wielopostaciowego z zastosowaniem technologii CRISPR/Cas9 wraz z jej szczegółową charakterystyką, zdefiniowanie transkryptomów macierzystych komórek linii glejaka wielopostaciowego (WT) i uzyskanych komórek CHI3L1 KO w celu wykrycia różnic w ekspresji genów i związanych z nimi szlaków metabolicznych.

W części badawczej, w kolejnych rozdziałach Doktorant przedstawia źródła analizowanego materiału genetycznego, zastosowane w badaniach linie komórkowe po czym w szczegółowy sposób opisuje proces przygotowania materiału genetycznego do analizy, zastosowaną technikę modyfikacji genetycznej wybranej linii komórkowej, technologię sortowania i selekcji klonalnej uzyskanych komórek wraz z technikami biologii molekularnej wykorzystywanymi dla potrzeb ich charakteryzacji, procedurę tworzenia modelu zwierzęcego wraz z technikami pozyskiwania materiału tkankowego i jego oceny. Jedynie w części poświęconej analizie publicznie dostępnych danych oraz analizie statystycznej, w ocenie Recenzenta, zabrakło informacji na temat kryteriów doboru narzędzi statystycznych (w jaki sposób prowadzona była analiza rozkładu zmiennych, na jakiej podstawie podjęto decyzje o zastosowaniu wybranych testów, czy stosowano transformację logarytmiczną danych dla ich normalizacji itp.)

Rozdział 4 Doktorant poświęca wynikom własnym, w podrozdziale 4.1 przedstawiając analizę ekspresji CHI3L1 w guzach glejopochodnych o różnym stopniu złośliwości. Następnie w kolejnym podrozdziale Autor definiuje źródła pochodzenia CHI3L1 w analizowanym materiale jednocześnie wykazując korelację pomiędzy poziomem CHI3L1 a ekspresją genów charakterystycznych dla podtypu mezenchymalnego glejaka wielopostaciowego. W ocenie Recenzenta, dane te mają kluczowe znaczenie ze względu na zastosowaną rozdzielczość na poziomie pojedynczej komórki; w kolejnym podrozdziale Doktorant uzupełnia je danymi dotyczącymi ekspresji CHI3L1 w różnych dostępnych komercyjnie liniach komórkowych. Mgr Cyranowski następnie przedstawia dane pochodzące z uzyskanej przez Autora linii komórkowej z wyłączoną ekspresją CHI3L1 ze szczegółowym

opisem jej walidacji oraz charakterystyką zmian w transkryptomie wynikających z wygaszenia ekspresji CHI3L1. Następnie Autor przedstawia dane pochodzące z modelu zwierzęcego z wykorzystaniem linii CHI3L1 KO i linii matczynej (WT) wraz z określeniem mechanizmów odpowiadających za stwierdzoną redukcję wzrostu guzów opartych na linii CHI3L1 KO.

W dyskusji, podzielonej na 5 podrozdziałów Autor rekapituluje uzyskane wyniki na tle doniesień literaturowych i konfrontuje uzyskane przez siebie wyniki z rezultatami badań innych autorów w kontekście wszystkich zmiennych analizowanych w rozdziale poświęconym wynikom. Szczególnie interesujący dla czytelnika wydają się być podrozdziały 5.4 i 5.5, które w sposób klarowny omawiają i wyjaśniają scharakteryzowane w rozdziale 4 mechanizmy odpowiedzialne za redukcję objętości guzów u zwierząt z deficytem CHI3L1 jak również za normalizację sieci naczyniowej w obrębie guzów wywodzących się z linii komórkowych z niedoborem CHI3L1.

We wnioskach będących podsumowaniem przeprowadzonej wcześniej analizy naukowej Doktorant podkreśla, że podczas gdy poziomy mRNA dla CHI3L1 są wysokie zarówno w łagodnych jak i złośliwych guzach glejopochodnych to poziomy białka CHI3L1 są istotnie podwyższone jedynie w guzach o wysokim stopniu złośliwości i liniach komórkowych wywodzących się z guzów złośliwych. Następnie zwraca uwagę na fakt, że wyłączenie ekspresji CHI3L1 z zastosowaniem techniki CRISPR/Cas9 nie wpływa na podstawowe procesy komórkowe, ale odpowiada za istotne zmiany w globalnej transkrypcji genów które są związane z obniżeniem ekspresji genów uczestniczących w modyfikacji macierzy zewnątrzkomórkowej oraz w procesie infiltracji guza przez komórki immunokompetentne i związaną z tym zjawiskiem immunosupresją. Dodatkowo Autor podkreśla fakt, że wyłączenie ekspresji CHI3L1 w ludzkich komórkach glejaka prowadzi do istotnego zmniejszenia wzrostu guzów *in vivo* co w jego ocenie jest najprawdopodobniej związane z obniżoną inwazyjnością komórek guza zależną od ekspresji MMP-2, zmniejszoną, zależną od Spp1, infiltracją i aktywacją komórek immunokompetentnych w obrębie guza oraz przywróceniem efektywnego procesu angiogenezy. Z perspektywy klinicznej najważniejszą wydaje się jednak być informacja, że CHI3L1 może być ważnym celem terapeutycznym dla przyszłych, personalizowanych strategii w leczeniu glejaka wielopostaciowego, gdyż przedstawione w dysertacji dane dokumentują rolę CHI3L1 jako czynnika napędzającego i podtrzymującego progresję glejaka wielopostaciowego.

W opinii Recenzenta o szczególnej wartości recenzowanej dysertacji decyduje jej kompleksowość, poczynając od analizy dostępnych danych w formie cyfrowej celem uzyskania wstępnych informacji ukierunkowujących dalsze etapy projektu, poprzez szczegółową analizę próbek pochodzących od pacjentów z różnymi podtypami guzów glejopochodnych i z dostępnych komercyjnie linii komórkowych zarówno na poziomie transkryptu jak i białka, stworzenie własnej linii komórkowej z wyłączoną ekspresję CHI3L1 i jej precyzyjne scharakteryzowanie oraz wykorzystanie modelu *in vivo* dla potrzeb charakterystyki porównawczej linii CHI3L1 KO w stosunku do pierwotnej, matczynej linii komórkowej. Powyższe podejście świadczy o bardzo dobrym warsztacie naukowym i dojrzałości Doktoranta co znakomicie rokuje na przyszłość. Jedynym, czego w mojej opinii brakuje w recenzowanej dysertacji to zawarcie (najlepiej w Dyskusji) podrozdziału poświęconego ograniczeniom zastosowanych technik i modeli, szczególnie z perspektywy przyszłych kierunków badań zarówno w zakresie nauk podstawowych jak i translacyjnych mających na celu zastosowanie uzyskanych wyników w praktyce klinicznej.

Całość rozprawy doktorskiej mgr Salwadora Cyranowskiego oceniam bardzo wysoko. Doktorant dowiódł, że jest dojrzałym badaczem, potrafiącym dobrać ciekawy temat badawczy o dużym znaczeniu poznawczym i potencjalnym praktycznym. Zebrany materiał został w prawidłowy sposób przeanalizowany oraz stał się podstawą do wyciągnięcia prawidłowych, logicznych wniosków. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668) w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018r. poz. 1669 z późn. zm.) zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Salwadora Cyranowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego jednocześnie wnioskując o wyróżnienie recenzowanej dysertacji ze względu na jej bardzo wysokie walory poznawcze.