



UNIwersytet Jagielloński
w Krakowie

Dr hab. Agnieszka Jaźwa-Kusior, prof. UJ
Zakład Biotechnologii Medycznej
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
Uniwersytet Jagielloński
ul. Gronostajowa 7
30-387 Kraków
email: agnieszka.jazwa@uj.edu.pl

Kraków, 13.08.2025

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Kamińskiej pt. „Rola receptora sortującego
SorLA w polaryzacji fenotypu mikrogleju w glejaku”**

Glejaki mózgu, a w szczególności glejaki wielopostaciowe (ang. *glioblastoma*, GBM), jest jednym z najbardziej agresywnych i śmiertelnych nowotworów ośrodkowego układu nerwowego. Charakteryzuje się szybkim wzrostem, naciekającym sposobem szerzenia się w tkankę mózgową oraz wysoką opornością na standardowe metody leczenia, obejmujące chirurgię, radioterapię i chemioterapię. Mimo intensywnych badań, mediana przeżycia pacjentów z GBM rzadko przekracza 15–18 miesięcy, a wskaźnik pięcioletniego przeżycia pozostaje poniżej 10%.

W ostatnich latach zidentyfikowano szereg zaburzeń genetycznych i epigenetycznych towarzyszących tej chorobie. Jednak mimo postępu, skuteczne terapie celowane wciąż pozostają wyzwaniem. Bariera krew–mózg utrudnia dostarczanie leków, a wysoka heterogenność nowotworu sprzyja oporności na leczenie. Ponadto mikrośrodowisko guza, w tym komórki glejowe, naczyniowe i immunologiczne, odgrywa kluczową rolę w podtrzymywaniu wzrostu i inwazyjności glejaka.

Prowadzenie badań nad molekularnymi mechanizmami glejaków ma fundamentalne znaczenie dla opracowania nowych strategii diagnostycznych i terapeutycznych. Integracja wiedzy z zakresu biologii molekularnej, genomiki i immunologii może przynieść przełom w leczeniu tego nieuleczalnego obecnie nowotworu. Praca doktorska Pani mgr Pauliny Kamińskiej znakomicie wpisuje się w ten nurt badań, podejmując istotne i aktualne zagadnienia dotyczące molekularnych mechanizmów glejaka oraz ich potencjalnych implikacji terapeutycznych.

Głównym celem przedstawionych w rozprawie badań było opisanie roli receptora sortującego SorLA w kształtowaniu właściwości mikrogleju i makrofagów związanych z glejakiem (ang. *glioma-associated microglia and macrophages*, GAMs), jak również scharakteryzowanie wpływu braku SorLA na rozwój guza i mikrośrodowisko mysiego glejaka. Poprawnie sformułowane cele szczegółowe dobrze korespondują z głównym celem pracy i są logicznie powiązane z postawioną hipotezą badawczą.

Praca ma układ klasyczny, obejmujący wstęp, przegląd literatury, część materiałowo-metodologiczną, prezentację wyników, ich omówienie oraz wnioski. Całość jest dobrze skomponowana i logicznie uporządkowana. Wstęp w sposób klarowny i wyczerpujący wprowadza czytelnika w problematykę badawczą, podkreślając aktualny stan wiedzy oraz znaczenie podjętego tematu. Za szczególnie istotny element części wprowadzającej uważam przedstawienie przez Doktorantkę wyników własnych uzyskanych w ramach stażu na Uniwersytecie we Freiburgu (Niemcy), obejmujących barwienia immunofluorescencyjne próbek ludzkiego mózgu – zarówno zdrowego, jak i pochodzącego od pacjentów z nowotworami mózgu, w tym z glejakiem – które uwidoczniły ekspresję białka SorLA w komórkach mikrogleju. Cennym uzupełnieniem tej analizy była przeprowadzona przez Autorkę interpretacja publicznie dostępnych danych typu single-cell RNA-seq pochodzących od pacjentów z glejakiem. Analiza ta wskazała na możliwą korelację poziomu ekspresji białka SorLA z funkcjonowaniem mikrogleju. Zestawienie i integracja tych obserwacji stanowiły solidną podstawę do sformułowania głównej hipotezy badawczej pracy, co należy ocenić jako istotny walor merytoryczny i dowód umiejętnego wykorzystania zarówno własnych, jak i dostępnych w literaturze źródeł danych.

Metodyka badań została dobrana w sposób przemyślany, umożliwiając wieloaspektową ocenę badanych zjawisk biologicznych. Wyniki zostały przedstawione bardzo starannie i przejrzysto, w układzie odpowiadającym postawionym celom, z zastosowaniem czytelnych tabel i rycin. W ramach pracy Doktorantka zastosowała uznany w badaniach przedklinicznych model mysiego glejaka GL261 oraz hodowle mysiego mikrogleju, realizując szeroki wachlarz analiz molekularnych i testów funkcjonalnych *in vitro*, w tym eksperymenty w układach współhodowli komórkowych. Na szczególne podkreślenie zasługują eksperymenty z wykorzystaniem konstruktów kodujących białko SorLA pozbawione określonych domen funkcjonalnych, co stanowiło precyzyjne narzędzie do analizy ich roli biologicznej. W oparciu o metodę ko-immunoprecypitacji Doktorantka wykazała nową, istotną funkcję badanego receptora w zakresie zdolności wiązania czynnika TNF α . Tym samym udowodniła, że SorLA ograniczając wydzielanie TNF α przez mikroglej, redukuje potencjał prozapalny tych komórek.

Wynik ten nie tylko wnosi nowe informacje do aktualnego stanu wiedzy na temat molekularnych mechanizmów oddziaływań w mikrośrodowisku glejaka, lecz także może mieć potencjalne implikacje dla rozwoju nowych strategii terapeutycznych ukierunkowanych na modulację tych interakcji.

Badania *in vitro* zostały uzupełnione eksperymentami *in vivo* z wykorzystaniem myszy z konstytutywnym nokautem genu kodującego białko SorLA (SorLA-KO). Mysi model glejaka został zbudowany w oparciu o precyzyjne, stereotaktyczne podanie komórek nowotworowych linii GL261 do wybranej półkuli mózgu. Takie podejście umożliwia kontrolowane i powtarzalne wprowadzenie komórek w określone miejsce mózgu, dzięki czemu możliwa jest szczegółowa analiza interakcji między komórkami guza a mikrośrodowiskiem w warunkach zbliżonych do naturalnych. Wielkość guzów monitorowana była u zwierząt przyżyciowo poprzez pomiar bioluminescencji po wprowadzeniu do mózgu komórek nowotworowych GL261 z nadekspresją lucyferazy. Takie oznakowanie guza umożliwiło nieinwazyjne i dynamiczne śledzenie progresji nowotworu w czasie rzeczywistym. Zastosowanie tej strategii świadczy o starannym i przemyślanym zaplanowaniu eksperymentu oraz o wszechstronnym podejściu Doktorantki do modelowania procesu chorobowego. Przeprowadzona analiza mikrośrodowiska nowotworu cechowała się kompleksowym i wieloaspektowym charakterem, obejmującym barwienia immunofluorescencyjne, pomiary poziomu mRNA, oznaczenia białek metodą Western blot i ELISA oraz szczegółową analizę składu komórkowego za pomocą cytometrii przepływowej. W efekcie Doktorantka wykazała, że myszy z konstytutywnym nokautem białka SorLA rozwijały mniejsze guzy mózgu w porównaniu do zwierząt typu dzikiego (WT). Towarzyszyły temu zmiany w morfologii mikrogleju, sugerujące jego aktywację o charakterze prozapalnym. Autorka wnioskuje zatem, że zablokowanie funkcji SorLA mogłoby prowadzić do nasilonego prozapalnego fenotypu mikrogleju w glejaku, co potencjalnie aktywowałoby komórki mikrogleju do efektywniejszej odpowiedzi przeciwnowotworowej. Ten kierunek badań jest obecnie szczególnie istotny i bardzo aktualny.

Dyskusja jest merytoryczna, obejmuje zarówno wnikliwą interpretację uzyskanych danych, jak i rzetelne odniesienie do wyników innych autorów. Należy podkreślić umiejętność Autorki w integrowaniu własnych obserwacji z aktualnym stanem wiedzy, co świadczy o jej dobrym zaznajomieniu z badaną tematyką oraz świadomości naukowej. Jednocześnie widoczny jest zdrowy krytycyzm i zdolność do dostrzegania ograniczeń własnych badań, czego przykładem jest zwrócenie uwagi na niedoskonałości konstytutywnego nokautu genu u myszy oraz próba wyjaśnienia rozbieżności w poziomie białka SPP1 między hodowlą mikrogleju z myszy SorLA-KO a próbkami pochodzącymi z nowotworowych półkul mózgu tych zwierząt.

Wskazanie przez Autorkę potencjalnych kierunków dalszych analiz również świadczy o jej dojrzałości badawczej. Przedstawione w pracy wnioski są spójne z prezentowanym materiałem, jasno sformułowane i adekwatne do zakresu przeprowadzonych badań.

Bibliografia została dobrana starannie i obejmuje aktualne, wiarygodne źródła, odzwierciedlające współczesny stan wiedzy w omawianej dziedzinie. Na uwagę zasługuje fakt, że Autorka uwzględniła również własny dorobek naukowy, czyli cztery publikacje, w których jest pierwszym autorem. Świadczy to nie tylko o umiejętności krytycznej analizy literatury, ale także o wysokim stopniu samodzielności naukowej oraz znaczącym wkładzie w rozwój badań w prezentowanym obszarze.

Z obowiązku recenzenta pragnę wskazać na nieliczne błędy i uchybienia:

- 1) W pracy brakuje informacji dotyczących płci myszy wykorzystanych w badaniach.
- 2) Z opisu metod wnioskuję, że implantacja komórek nowotworowych do mózgu była wykonywana do prawej półkuli. Czy wybór tej lokalizacji miał określone uzasadnienie eksperymentalne lub biologiczne?
- 3) Rycina 11 (str. 77) pokazuje ekspresję genu *Sor11* w pierwotnym mysim mikrogleju normalizowaną do $\beta 2M$ (A – stymulacja LPS) oraz *Hprt1* (B – współhodowla z GL261). Jednak, w opisie ryciny jest odwrotny zapis: „Poziom ekspresji *Sor11* normalizowano do poziomu ekspresji genów referencyjnych (A) *Hprt1* oraz (B) $\beta 2M$ ”. Z czego wynikał wybór różnych genów referencyjnych?
- 4) Rycina 21 (str. 92) — w analizie MS zastosowano relatywnie niski próg zmiany ekspresji $\log_2FC \geq 0,2$ lub $\leq -0,2$ w porównaniu do np. zastosowanego dla innej analizy (Rycina 13, str. 80) progu $\log_2FC \geq 0,3$ lub $\leq -0,3$. W pracy nie znalazłam jednak uzasadnienia metodycznego lub biologicznego przyjęcia takich wartości progowych.
- 5) Rycina 38E-F – jak podano na str. 111 do rozróżnienia populacji monocytów i makrofagów zastosowano m.in. różnice w poziomie ekspresji markera F4/80. Jest to klasyczny marker dojrzałych makrofagów, dlatego budzi moje wątpliwości fakt, że populację monocytów zdefiniowano jako F4/80^{wysoki}, a makrofagów jako F4/80^{niski}. Prosiłabym o wyjaśnienie i komentarz w tej kwestii.
- 6) Rycina 40 (str. 115) – brakuje wyjaśnienia, co oznaczają jednostki T/l i G/l.
- 7) W treści pracy w rozdziale Dyskusja (str. 118) pojawia się stwierdzenie dotyczące potrzeby przeprowadzenia doświadczeń z wykorzystaniem myszy genetycznie modyfikowanych w taki sposób, aby gen *Sor11* nie ulegał ekspresji wyłącznie w komórkach mikrogleju. Zdanie to uważam za mało precyzyjne, co utrudnia zrozumienie

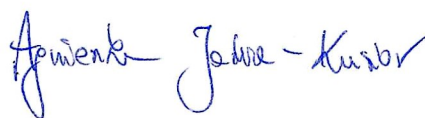
proponowanego eksperymentu oraz jego celu. Proszę, aby Doktorantka w trakcie obrony pracy dokładniej wyjaśniła tę kwestię, precyzując, jakie konkretne modele i strategie genetyczne miałyby zostać zastosowane oraz jak ich użycie pozwoliłoby jednoznacznie określić wpływ braku białka SorLA na funkcje mikrogleju.

W pracy pojawiły się ponadto nieliczne błędy składniowe oraz sporadyczne omyłki edytorskie, prawdopodobnie wynikające z automatycznych podmian w edytorze tekstu (np. zapis „koimmunopercypitacja” zamiast „koimmunoprecypitacja”). Nie wpływają one jednak w istotny sposób na zrozumiałość treści.

Podsumowując, rozprawa doktorska Pani mgr Pauliny Kamińskiej stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego, wnosząc nowe informacje dotyczące roli białka sortującego SorLA w kształtowaniu właściwości mikrogleju w glejaku. Zastosowany w pracy nowoczesny i wieloaspektowy warsztat badawczy pozwolił na pełną i prawidłową realizację postawionych celów. Uzyskane wyniki otwierają perspektywę ich praktycznego wykorzystania. Nieliczne uwagi i spostrzeżenia w żaden sposób nie umniejszają wartości merytorycznej rozprawy.

Niniejszym stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Pauliny Kamińskiej spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2024 poz. 1571 z późn. zm.). W związku z powyższym, wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej o dopuszczenie mgr Pauliny Kamińskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora. Ponadto, z uwagi na wysoką wartość naukową pracy i fakt, że część zaprezentowanych w rozprawie wyników została w ubiegłym roku opublikowana w prestiżowym czasopiśmie EMBO reports (Kaminska P i in., SorLA restricts TNF α release from microglia to shape a glioma-supportive brain microenvironment), wnioskuję o wyróżnienie rozprawy.

Z wyrazami szacunku,



Agnieszka Jaźwa-Kusior

RE: **Recenzja rozprawy doktorskiej**

Warszawa 15/08/2025

Doktorant: mgr Paulina Kamińska

.....

Tytuł rozprawy doktorskiej:

Rola receptora sortującego SorLA w polaryzacji fenotypu mikrogleju w glejaku

.....

Promotor: dr hab. Anna Malik

.....

Recenzent: dr hab. n. med. Jakub Godlewski

.....

Opinia o rozprawie doktorskiej

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska dotyczy niezwykle aktualnego i istotnego problemu badań nad biologicznymi mechanizmami rozwoju glejaka wielopostaciowego (GBM) – jednego z najbardziej agresywnych nowotworów mózgu u dorosłych. Autorka skoncentrowała się na roli receptora sortującego SorLA w kształtowaniu właściwości mikrogleju i makrofagów związanych z glejakiem (tzw. GAMs – *glioma-associated microglia and macrophages*), ze szczególnym uwzględnieniem potencjalnych mechanizmów, które mogą sprzyjać lub przeciwdziałać rozwojowi guza.

Już sam wybór tematu należy ocenić bardzo pozytywnie – praca łączy zagadnienia neuroimmunologii, onkologii i biologii molekularnej, poruszając jednocześnie aspekt translacyjny, istotny z punktu widzenia opracowywania nowych strategii terapeutycznych. Szczególnie interesujący jest wątek dotyczący możliwości przeprogramowania fenotypu GAMs w kierunku prozapalnym, co może otworzyć drogę do innowacyjnych immunoterapii przeciwnowotworowych.

1. Układ pracy i przegląd literatury

Rozprawa ma przemyślaną i logiczną strukturę. We wstępie autorka bardzo starannie omawia tło kliniczne i biologiczne problemu. Opis epidemiologii nowotworów mózgu, przegląd obecnie stosowanych strategii terapeutycznych w leczeniu GBM oraz charakterystyka mikrogleju i makrofagów w mikrośrodkowisku guza tworzą solidną podstawę teoretyczną do późniejszych rozważań.

W mojej ocenie szczególnie wartościowe jest wprowadzenie poświęcone receptorom z domeną VPS10P, a w tym receptorowi SorLA – dotąd stosunkowo rzadko omawianemu w kontekście nowotworów mózgu. Autorka w klarowny sposób przedstawia zarówno znane funkcje neuronalne SorLA, jak i hipotezy dotyczące jego roli w komórkach nieneuronalnych. Ten fragment świadczy o dużej erudycji i umiejętności syntetyzowania wiedzy z różnych obszarów biologii komórki.

Jedyną drobną uwagą na tym etapie jest to, że część przeglądu literatury mogłaby zostać skrócona na rzecz bardziej szczegółowego wprowadzenia do istniejących danych eksperymentalnych dotyczących interakcji SorLA z białkami układu odpornościowego w innych modelach chorób. Pozwoliłoby to jeszcze wyraźniej zarysować lukę badawczą, którą praca stara się wypełnić.

2. Cele i hipoteza badawcza

Cele pracy zostały sformułowane jasno i są w pełni uzasadnione zarówno klinicznie, jak i naukowo. Hipoteza, że wysoki poziom SorLA w GAMs wiąże się z ich właściwościami pronowotworowymi, jest logicznym następstwem wcześniejszych analiz bioinformatycznych. Dobrze, że autorka zaplanowała badania zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*, a ich zakres obejmuje szerokie spektrum – od regulacji ekspresji genu Sorl1 po analizę morfologii mikrogleju i ocenę wielkości guza w modelu mysim.

Podkreślenia wymaga fakt, że praca nie ogranicza się do prostego opisu zjawisk, lecz zmierza do wyjaśnienia mechanizmów molekularnych, w tym identyfikacji domeny SorLA odpowiedzialnej za wiązanie TNF- α . Takie podejście świadczy o dojrzałości naukowej i umiejętności projektowania badań o dużym potencjale poznawczym.

3. Część eksperymentalna i wyniki

Wyniki zostały przedstawione w sposób przejrzysty i logiczny. Autorka wnikliwie analizuje wpływ różnych czynników na ekspresję Sorl1 w mikrogleju, wykazując, że polaryzacja fenotypu komórek wpływa istotnie na poziom transkrypcji tego genu. Bardzo interesująca jest obserwacja, że stymulacja prozapalna (LPS) obniża ekspresję Sorl1, podczas gdy stymulacja za pomocą CX3CL1 ją zwiększa – jest to wynik, który może mieć istotne implikacje dla zrozumienia plastyczności funkcjonalnej GAMs.

Cenne jest także odkrycie, że SorLA wiąże TNF- α za pośrednictwem domeny EGF/ β p, co prawdopodobnie ogranicza wydzielanie tej cytokiny przez mikroglej. Wyniki te sugerują, że SorLA może pełnić funkcję „modulatora” odpowiedzi zapalnej w mikrogleju, co stanowi nowy i oryginalny wkład w wiedzę o biologii tego receptora.

Na uwagę zasługują również dane *in vivo*, pokazujące, że myszy pozbawione SorLA rozwijają mniejsze guzy mózgu, a mikroglej w ich mikrośrodowisku wykazuje wyraźne cechy aktywacji prozapalnej. Ta część badań jest szczególnie wartościowa z perspektywy potencjalnych zastosowań translacyjnych.

Jeżeli miałbym wskazać jeden obszar, który mógłby zostać rozwinięty, to byłaby to bardziej pogłębiona analiza ilościowa i jakościowa interakcji mikrogleju z innymi typami komórek układu odpornościowego w mikrośrodowisku guza – choć część takich analiz (cytometria przepływowa, barwienia immunofluorescencyjne) została wykonana, ich interpretacja mogłaby być jeszcze szersza.

4. Dyskusja i wnioski

Dyskusja jest obszerna, a jej mocną stroną jest umiejętne połączenie wyników własnych z aktualnym stanem wiedzy. Autorka trafnie interpretuje dane w kontekście hipotezy początkowej, a także wskazuje potencjalne konsekwencje translacyjne swoich badań – w tym możliwość celowego zablokowania funkcji SorLA w celu przeprogramowania GAMs w kierunku prozapalnym.

Wnioski są logiczne, spójne z przedstawionymi wynikami i unikają nadmiernych spekulacji. Cieszy fakt, że autorka podkreśla nowatorski charakter obserwacji dotyczących roli SorLA w komórkach mikrogleju, co jest ważnym elementem oryginalności rozprawy.

5. Walory i znaczenie pracy

Do najważniejszych zalet rozprawy należy zaliczyć:

- aktualność i znaczenie tematu dla onkologii i neuroimmunologii,
- bardzo dobre przygotowanie merytoryczne autorki i umiejętność łączenia wiedzy z różnych dziedzin,
- kompleksowe podejście obejmujące zarówno modele *in vitro*, jak i *in vivo*,
- oryginalne wyniki dotyczące funkcji SorLA w mikrogleju i jego wpływu na mikrośrodowisko glejaka,
- klarowną i przemyślaną strukturę pracy.

Nieliczne uwagi krytyczne mają charakter raczej redakcyjny i rozwojowy – pewne fragmenty przeglądu literatury mogłyby być skrócone, a niektóre analizy interakcji immunologicznych w mikrośrodowisku guza mogłyby zostać rozszerzone.

6. Podsumowanie

Podsumowując, przedstawiona rozprawa doktorska jest dziełem o wysokiej wartości naukowej, wnoszącym oryginalny wkład w zrozumienie mechanizmów regulujących funkcję mikrogleju w glejaku wielopostaciowym. Wyniki mają znaczenie zarówno poznawcze, jak i potencjalnie



*Jakub Godlewski Ph.D.
Chair of the Department of Neurooncology
Mossakowski Medical Research Institute
Polish Academy of Sciences
02-106 Warsaw 5 Pawińskiego Street
jgodlewski@imdik.pan.pl*

aplikacyjne, a zaprezentowane wnioski mogą stanowić punkt wyjścia dla dalszych badań nad terapiami celującymi w mikrośrodowisko guza.

Praca jest napisana w sposób klarowny, z dbałością o szczegóły metodologiczne i interpretacyjne, a autorka wykazała się dużą samodzielnością i umiejętnością krytycznej analizy. Z przekonaniem stwierdzam, że rozprawa spełnia kryteria stawiane pracom doktorskim i zasługuje na wyróżnienie.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2024 poz. 1571 z późn. zm.). W związku z powyższym, wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej o dopuszczenie mgr Pauliny Kamińskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora

Jakub Godlewski, Ph.D.

Prof. dr hab. Monika Pietrowska

Narodowy Instytut Onkologii

im. Marii Skłodowskiej - Curie - Państwowy Instytut Badawczy

Oddział w Gliwicach

ul. Wybrzeże Armii Krajowej 15

44-102 Gliwice

tel. (32) 278 96 72

e-mail: monika.pietrowska@gliwice.nio.gov.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Kamińskiej pt. **"Rola receptora sortującego SorLA w polaryzacji fenotypu mikrogleju w glejaku"**

zrealizowana w Pracowni Neurobiologii Molekularnej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, PAN oraz w Grupie Badawczej Neurobiologii Komórkowej Uniwersytetu Warszawskiego pod kierunkiem dr hab. Anny Malik

Glejaki wielopostaciowe (ang. glioblastoma multiforme, GBM) jest agresywnym nowotworem złośliwym mózgu osób dorosłych, charakteryzującym się krótkim czasem przeżycia pacjentów. Charakterystyczną cechą nowotworu jest jego mikrośrodowisko, które stanowi mikroglej i makrofagi. Przeprogramowanie komórek układu immunologicznego oraz innych komórek obecnych w mikrośrodowisku powoduje, że przestają realizować swoje funkcje, czyli hamować rozwój guza, a zamiast tego wspierają jego wzrost i ograniczają odpowiedź przeciwnowotworową. Nowoczesne terapie eksperymentalne w leczeniu glejaka wielopostaciowego (GBM) koncentrują się głównie na przezwycięzeniu oporności nowotworu na klasyczne leczenie oraz na precyzyjnym celowaniu w komórki nowotworowe, w tym tzw. glioma stem-like cells (GSCs), które odpowiadają za nawroty choroby. Metody leczenia bazujące na zmianie zachowania komórek układu immunologicznego i odkrycie mechanizmów odpowiedzialnych za kształtowanie ich zachowania być może przybliży nas do odniesienia sukcesów terapeutycznych w leczeniu nowotworów.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska bada udział białka SorLA w modyfikacji fenotypu mikrogleju w glejaku. Badane przez Doktorantkę białko jest wewnątrzkomórkowym receptorem sortującym, który wpływa na lokalizację białek w komórce, biorąc udział w ich transporcie pomiędzy organellami. Ekspresja tego białka została zidentyfikowana w komórkach glejowych, w tym w mikrogleju. Na podstawie wcześniejszych nieopublikowanych badań (analizy immunofluorescencyjne mikrogleju w mikrośrodowisku GBM oraz gwiazdki typu 2 (praca wykonana przez Doktorantkę) – rycina 6 strona 39, oraz danych transkryptomicznych ludzkich próbek – rycina 7, strona 40) o istotnej roli tego białka w kształtowaniu właściwości mikrogleju i makrofagów związanych z glejakiem (GAMs) Autorka podjęła się realizacji przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej. Analiza danych transkryptomicznych

wykazała, że poziom genu kodującego SorLA w GAMs różni się w zależności od jego potencjalnych właściwości pronowotworowych. Doktorantka sformułowała hipotezę badawczą, że wysoki poziom SorLA w GAMs związany jest z tymi właściwościami pronowotworowymi, co może wiązać się z rolą tego receptora w kształtowaniu tej funkcji. Doktorantka podjęła się zadania zbadania wpływu SorLA na jego właściwości poprzez między innymi: określenie czynników wpływających na jego ekspresję w mikrogleju, zidentyfikowanie białek wydzielanych przez mikrogleję w sposób zależny od SorLA, określenie wpływu SorLA w modelu in vivo pozbawionym białka SorLA. W pracy doktorskiej Doktorantka wykorzystuje podstawowe techniki biologii molekularnej, a swoje badania prowadzi zarówno w układzie in vitro jak i in vivo, co nie jest częste na tym etapie rozwoju kariery naukowej. Doktorantka wykorzystuje nowoczesne i adekwatne do postawionych sobie celów metody badawcze. Temat rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Kamińskiej oceniam jako aktualny oraz wysoce adekwatny w stosunku do problematyki współczesnych badań biomedycznych.

Rozprawa doktorska mgr Pauliny Kamińskiej składa się z ośmiu głównych rozdziałów i liczy 167 stron, podzielona jest na część teoretyczną (wstęp, cele pracy) oraz eksperymentalną (wyniki, dyskusja, podsumowanie i wnioski oraz wykaz piśmiennictwa). Opis rozprawy jest szczegółowy, więc Recenzent jest w stanie ocenić dobór metod do założonych celów pracy, uzyskane wyniki oraz wyciągnięte wnioski. Dobór piśmiennictwa (264 pozycje) jest adekwatny do treści pracy i nie ogranicza się jedynie do najnowszych prac, ale obejmuje również wcześniejsze prace źródłowe. Rozprawa doktorska napisana jest w języku polskim. Układ pracy jest zdecydowanie tradycyjny z podziałem na rozdziały i podrozdziały. Pracę doktorską rozpoczyna „Wstęp”, w którym Doktorantka zapoznaje czytelnika z modelem badań (glejak wielopostaciowy), strategiami leczenia oraz rolą mikrogleju i makrofagów jako elementów mikrośrodowiska mających wpływ na rozwój nowotworu i będący przedmiotem prowadzonych badań. W rozdziale tym Doktorantka wyjaśnia powody podjęcia się realizacji wybranej tematyki, wprowadzając uzyskane na poprzednich etapach badań wyniki będące podstawą do realizacji prezentowanej pracy doktorskiej. Oceniając tę część pracy stwierdzam, że podrozdziały prezentujące teoretyczny kontekst realizowanych badań są napisane w sposób przejrzysty i bardzo przystępny. Jedyna istotna uwaga dotyczy potrzeby bardziej przemyślanego doboru treści w zakresie metodycznej perspektywy wykonywanych badań. Autorka poświęca stosunkowo niewiele miejsca na omówienie i uzasadnienie przyjętej metodologii, co utrudnia ocenę trafności doboru narzędzi badawczych oraz interpretację wyników. Dokładniejsze wyjaśnienie założeń metodologicznych, uzasadnienie wyboru konkretnych metod lub technik badawczych, odniesienie się do alternatywnych podejść, które mogłyby zostać zastosowane w podobnym kontekście zdecydowanie poprawiłoby odbiór metodycznej części pracy. W rozdziale „Materiały i metody” mgr Paulina Kamińska z różnym stopniem dokładności opisuje wykonane analizy, szczególnie podrozdział dotyczący analizy statystycznej wymaga uzupełnienia. Jest to dość istotne, gdyż Doktorantka uzyskiwała wyniki (prezentowane w rozdziale 4.2 strona 79) technikami wysokoprzepustowymi generującymi duże zbiory danych, których analiza statystyczna (bioinformatyczna) ma określony protokół postępowania. W rozdziale metodycznym zauważalny jest brak opisu przygotowania próbek do analizy technikami spektrometrii mas oraz sposobu opracowania uzyskanych danych. Jest to istotna luka, ponieważ szczegółowe przedstawienie procedur analitycznych stanowi fundament oceny wyników badawczych, nawet jeśli zlecono ich wykonanie warto byłoby

uwzględnić: rodzaj i sposób przygotowania próbek (np. homogenizacja, ekstrakcja, oczyszczanie), zastosowane warunki instrumentalne (typ spektrometru, tryb jonizacji, zakres m/z, czas analizy), metody kalibracji i kontroli jakości danych (np. użycie wzorców wewnętrznych, powtarzalność pomiarów), sposób analizy danych (oprogramowanie, algorytmy identyfikacji, kryteria selekcji sygnałów). Część teoretyczna kończy się prezentacją celu pracy, który został przedstawiony jasno i precyzyjnie. Co istotne, cel ten koresponduje z treścią rozdziału VI — „Podsumowanie i wnioski”, co świadczy o spójnej strukturze pracy oraz konsekwentnej realizacji założeń badawczych. Taka zgodność między intencją, a rezultatem jest dużym atutem pracy i podkreśla jej logiczną konstrukcję.

W części teoretycznej swojej rozprawy doktorskiej mgr Paulina Kamińska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie nauki biologiczne.

Moja uwaga odnośnie prezentacji uzyskanych wyników dotyczy dwóch aspektów. Jeden to prezentacja w pracy doktorskiej (nie tylko w tabeli 1, ale i pozostałych tego typu opracowaniach danych) miejsc znaczących i jednorodnego zapisu liczb dziesiętnych. Podawanie wyników z dokładnością do np. 8 miejsc po przecinku może wydawać się wyrazem precyzji, jednak w większości przypadków jest to nieuzasadnione i może wprowadzać czytelnika w błąd co do rzeczywistej dokładności danych. Problemem jest brak spójności między dokładnością pomiarową, a prezentowaną precyzją liczbową. Jeśli pomiar lub dane wejściowe mają dokładność do 2-3 miejsc znaczących, podawanie wyniku z dokładnością do 8 miejsc po przecinku jest sztuczne i mylące. Taki zapis sugeruje precyzję, której nie da się uzasadnić metodologicznie.

W rozdziale „Wyniki” brakuje informacji dotyczących liczby zidentyfikowanych białek, co znacząco ogranicza możliwość oceny jakości oraz efektywności przeprowadzonych analiz proteomicznych. Liczba ta stanowi podstawowy wskaźnik skuteczności zastosowanej metody spektrometrii mas i jest kluczowa dla oceny czułości, selektywności oraz powtarzalności wyników. Brak tej informacji ogranicza możliwość weryfikacji uzyskanych wyników, zwłaszcza, że prezentowane są wyłącznie w postaci wykresów typu „volcano plot” czyli już po wykonaniu analizy statystycznej. W kontekście badań proteomicznych, podanie liczby zidentyfikowanych białek — wraz z kryteriami ich identyfikacji (np. liczba unikalnych peptydów, poziom FDR, minimalna intensywność sygnału) — jest niezbędne dla pełnej interpretowalności wyników. Tabela 5 (strona 93) ilustrująca już uzyskane wyniki analiz byłaby w pełni interpretowalna, gdyby Doktorantka podała wyjściowe wartości intensywności dla podanych/wybranych białek. Kryterium wyboru białek różnicujących (strona 91) pozwoliło Autorce na wyselekcjonowanie trzech grup białek różnicujących pomiędzy badanymi genotypami, to sposób prezentacji tych wyników oraz ich interpretacja wymaga według Recenzenta doprecyzowania. Przede wszystkim brakuje jasnych informacji o kryteriach ostatecznej selekcji białek (podanych w tabeli 5, strona 93) — nie podano czy oparto się na określonym progu istotności statystycznej, fold change, analizie funkcjonalnej, czy innych parametrach biologicznych. Z wykresu (rycina 21) wynika, że białek spełniających kryteria opisane w rozdziale 4.5 było więcej niż ostatecznie znalazło się w tabeli 5. Czy Autorka mogłaby wyjaśnić te pojawiające się wątpliwości?

Zastosowanie testów immunoenzymatycznych ELISA jako metody walidacyjnej dla wyników uzyskanych w analizie MS (spektrometria mas) jest podejściem właściwym, ale niekoniecznie

standardowym. Niemniej jednak, opis tej części eksperymentu wymaga doprecyzowania, zarówno pod względem merytorycznym, jak i metodologicznym. W kontekście zastosowania testów ELISA jako metody walidacyjnej dla wyników uzyskanych techniką spektrometrii mas, warto zaznaczyć, że ELISA – jako metoda celowana – wymaga wcześniejszej selekcji konkretnych białek i nie pozwala na analizę globalną, jaką umożliwiają niecelowane podejścia MS. Dodatkowo, ELISA charakteryzuje się niższą czułością w porównaniu z nowoczesnymi metodami MS, co może wpływać na wykrywalność białek obecnych w niskim stężeniu. Z tego względu brak pełnego potwierdzenia wyników MS w ELISA nie musi świadczyć o ich błędności, lecz może wynikać z ograniczeń analitycznych testu. Z kolei zgodność pomiędzy obiema metodami, jeśli zostanie odpowiednio udokumentowana, stanowi istotne wzmocnienie wiarygodności danych. Warto jednak, by Autorka pracy wyraźnie odniosła się do różnic w charakterze obu technik, a także ich potencjalnych konsekwencji dla interpretacji uzyskanych wyników.

Poza powyższymi uwagami odnoszącymi się głównie do aspektów metodologicznych oraz prezentacji uzyskanych wyników mam kilka pytań do których chciałabym, aby Doktorantka odniosła się podczas publicznej obrony pracy:

- (1) Jakie modele badawcze (komórkowe, zwierzęce) są najbardziej odpowiednie do badania roli SorLA w mikrogleju w glejaku? Jakie ograniczenia mają zastosowane przez Doktorantkę modele badawcze?
- (2) Czy nadekspresja SorLA w modelach *in vitro* lub/i *in vivo* wpływa na wzrost i inwazyjność guza glejaka?
- (3) Czy SorLA może być potencjalnym celem terapeutycznym w leczeniu glejaków poprzez modulację funkcji mikrogleju?
- (3) Czy istnieje możliwość farmakologicznej modulacji SorLA w kontekście immunoterapii glejaka? Czy taka terapia miałaby zdaniem Doktorantki sens w kontekście uzyskanych wyników?
- (4) Czy stosuje się strategię blokowania interakcji SorLA z ligandami z wykorzystaniem przeciwciała przeciwko SorLA?

Praca jest ilustrowana 40 rycinami. Niestety nie zawsze są one czytelne (dotyczy to szczególnie zdjęć wykonanych z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego, np. rycina 23 A, strona 95). Myślę, że częścią problemu może być kwestia wyglądu tego typu obrazów na wydruku.

W przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej Autorka nie uniknęła błędów językowych, stylistycznych oraz powtórzeń utrudniających zrozumienie tekstu np.:

{rozdział 4.1, strona 77} „Analiza poziomu ekspresji genu *Sorl1* wykazała, że traktowanie komórek z wykorzystaniem LPS powoduje spadek poziomu ekspresji *Sorl1* (Rycina 11A), podczas gdy pod wpływem współhodowli z komórkami GL261 poziom jego transkryptu w mikrogleju wzrasta (Rycina 11B), co wskazuje, iż w zależności od kierunku aktywacji mikrogleju, poziom ekspresji genu kodującego SorLA ulega zmianom.” Dużo prościej i krócej mogłoby być: „Analiza wykazała, że stymulacja LPS prowadzi do obniżenia ekspresji *Sorl1* (Rycina 11A), natomiast współhodowla z komórkami GL261 zwiększa poziom jego transkryptu w mikrogleju (Rycina 11B). Wyniki te sugerują, że ekspresja genu kodującego SorLA jest modulowana w zależności od kierunku aktywacji mikrogleju.”. Momentami zauważalne są również niekonsekwencje terminologiczne (np. przemienne stosowanie polskich

i angielskich nazw białek lub procesów biologicznych bez wyjaśnienia), a także nadmiernie rozbudowane zdania, które wymagają uproszczenia i podziału dla zwiększenia przejrzystości. W kilku fragmentach Autorka łączy prezentację własnych wyników z odniesieniami do literatury i wnioskami o charakterze interpretacyjnym, co w mojej opinii zaciera granicę między tym, co zostało bezpośrednio zaobserwowane, a tym, co stanowi próbę wyjaśnienia mechanizmu na podstawie istniejących doniesień naukowych. Tego typu treści — choć niewątpliwie istotne — powinny być w większym stopniu przesunięte do rozdziału „Dyskusja”, gdzie jest przestrzeń na zestawienie wyników własnych z danymi literaturowymi i formułowanie szerszych uogólnień. Dla zwiększenia przejrzystości, warto byłoby jednoznacznie oddzielić, które stwierdzenia wynikają bezpośrednio z uzyskanych danych (np. wzrost kolokalizacji), a które są hipotezami wymagającymi dalszych badań (np. mechanizm egzocytozy jako przyczyna zwiększonego wydzielania TNF- α) – strona 91, rozdział „Wyniki”.

Wyniki badań przedstawione w części doświadczalnej rozprawy doktorskiej pozostają w pełnej zgodności z zakresem tematycznym pracy oraz potwierdzają wysoki poziom merytoryczny i praktyczny prowadzonych badań. Zastosowane podejścia badawcze obejmują nowoczesne i zaawansowane technologie biologii molekularnej, takie jak spektrometria mas, testy immunoenzymatyczne (ELISA), czy analizy ekspresji białek, co świadczy o bardzo dobrej znajomości aktualnych metod eksperymentalnych oraz umiejętności ich prawidłowego wykorzystania i interpretacji. Wyniki zostały opublikowane w czasopiśmie naukowych, a w czterech z nich mgr Paulina Kamińska jest pierwszym autorem. W przypadku Doktorantki takie osiągnięcia należy uznać za znaczące. Osiągnięcia Doktorantki uważam za bardzo dobre na tym etapie jej kariery naukowej. Warto podkreślić, że dorobek publikacyjny Doktorantki (zaprezentowany w rozdziale „Publikacje Doktorantki”) jest bezpośrednio powiązany z tematyką rozprawy – cztery z opublikowanych prac naukowych dotyczą bezpośrednio zagadnień podejmowanych w dysertacji, co nie tylko wzmacnia wiarygodność prezentowanych wyników, ale także potwierdza aktywność badawczą Autorki w obszarze swojej specjalizacji.

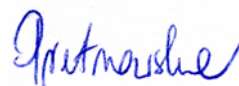
Wnioski – ocena pracy doktorskiej wraz z uzasadnieniem

Podsumowując, mocną stroną pracy jest wstęp teoretyczny w którym jego Autorka wykazała się interdyscyplinarną wiedzą z zakresu tematyki pracy doktorskiej. Praca doktorska, której podjęła się mgr Paulina Kamińska jest interdyscyplinarna i wymaga bardzo wszechstronnej wiedzy. Metodyka zastosowana w prezentowanej do oceny pracy doktorskiej jest adekwatna do postawionych hipotez badawczych. Autorka wykorzystwała w realizacji swojej pracy doktorskiej nowoczesne techniki biologii molekularnej, komórkowej oraz obrazowania, w tym hodowle pierwotne mikrogleju, techniki analizy białek/peptydów (wysokorozdzielcza spektrometria mas), modele in vitro i in vivo. Dane przedstawione w rozprawie są spójne, dobrze udokumentowane i potwierdzają udział SorLA w regulacji fenotypu mikrogleju w kontekście glejaków. Ponadto, Autorka wykazała, że myszy pozbawione SorLA rozwijają mikroglej w mikrośrodku glejaka wykazujący cechy morfologiczne aktywacji prozapalnej. Rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, a w trakcie jej realizacji wykazano nieznane dotychczas funkcje receptora SorLA w mikrogleju.

Zastrzeżenia zawarte w recenzji nie wpływają na moją dobrą ocenę rozprawy doktorskiej Pani mgr Pauliny Kamińskiej. Dorobek naukowy dołączony do pracy doktorskiej dowodzi dojrzałości naukowej Pani mgr Pauliny Kamińskiej, jej umiejętności posługiwania się technikami z zakresu biologii molekularnej, analizy danych i uzasadnia ubieganie się o stopień doktora. Ponadto rozprawa stanowi rozwiązanie problemu naukowego, wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną Kandydatki w danej dyscyplinie oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Na podstawie przeprowadzonej analizy stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska Pani mgr Pauliny Kamińskiej, jej treść i jakość mimo wskazanych w powyżej uwag w pełni odpowiadają wymogom stawianym rozprawom doktorskim oraz wskazują na dużą samodzielność oraz dojrzałość naukową Kandydatki. Stąd rekomenduję dopuszczenie przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Kamińskiej do dalszych etapów postępowania oraz jej publicznej obrony.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2024 poz. 1571 z późn. zm.).



Prof. dr hab. Monika Pietrowska