

Poznań, 06 lutego 2026

dr hab. Paulina Jackowiak, prof. ICHB PAN
Pracownia Analiz Pojedynczych Komórek
Instytut Chemii Bioorganicznej
Polskiej Akademii Nauk

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Patrycji Rosy,
zatytułowanej**

***„Understanding of processes driving microglia repopulation in young and old mice by applying
scRNA-seq technology”***

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została wykonana w Pracowni Neurobiologii Molekularnej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN. Promotorem pracy jest Pani prof. dr hab. Bożena Kamińska-Kaczmarek, natomiast promotorem pomocniczym Pan dr Aleksander Jankowski. Rozprawa dotyczy zjawiska odtwarzania mikrogleju u myszy młodych i w okresie starzenia.

Mikroglej, czyli komórki nieneuronalne ośrodkowego układu nerwowego, odgrywają kluczową rolę w utrzymaniu jego homeostazy. Uczestniczą w odpowiedzi immunologicznej, a także są zaangażowane w kontrolowanie proliferacji i różnicowania komórek neuronalnych oraz tworzenia synaps i modyfikacji połączeń synaptycznych. Prekursory mikrogleju migrują do rozwijającego się ośrodkowego układu nerwowego we wczesnym okresie embriogenezy, zanim bariera krew-mózg zostanie w pełni uformowana. Dają w ten sposób początek heterogennej samoodnawialnej populacji komórek, która utrzymuje się przez całe życie. Zdolność mikrogleju do samoodtwarzania jest cechą wyróżniającą go spośród większości populacji ośrodkowego układu nerwowego i stanowi przedmiot intensywnych badań. Mikroglej charakteryzuje się wysoką plastycznością w odpowiedzi na bodźce, a także zmienia się podczas ontogenezy. W ostatnich latach opisano szereg stanów transkrypcyjnych mikrogleju, typowych dla poszczególnych etapów życia czy procesów patologicznych. Starzenie się jest związane z dysfunkcją mikrogleju, która prowadzi do zakłóceń samoodtwarzania, zaburzeń homeostazy ośrodkowego układu nerwowego i zwiększa podatność na choroby neurodegeneracyjne. Oceniana praca doktorska koncentruje się na pytaniu, czy komórki mikrogleju nowo zasiedlające ośrodkowy układ nerwowy w pełni odtwarzają prawidłowy stan oraz funkcjonalną heterogenność wcześniejszej populacji, a także w jaki sposób przebieg procesu samoodtwarzania mikrogleju zmienia się podczas starzenia. Tym samym, rozprawa podejmuje problem naukowy o istotnym znaczeniu dla obecnej neurobiologii molekularnej i biomedycyny.

Praca doktorska ma formę monografii napisanej w języku angielskim, o klasycznym układzie. Obejmuje streszczenie w języku angielskim i polskim, Wstęp, Cel, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusję

oraz Wnioski. Ponadto zawiera wykaz skrótów, spis cytowanej literatury oraz listę trzech publikacji, których Doktorantka jest współautorką. Jedna z tych prac, opublikowana w *Journal of Neuroinflammation* (IF₂₀₂₄ 10.1), zawiera część wyników zaprezentowanych w ocenianej rozprawie. Strona formalna pracy nie budzi zasadniczych zastrzeżeń, choć miejscami tekst wymagałby dopracowania pod względem redakcyjnym i strukturalnym. Można bowiem zauważyć m.in. brak odwołań do niektórych rysunków (np. rys. 3.1, 3.3, 3.4, 3.5, 5.1, 6.5) czy umieszczenie rysunków w innych podrozdziałach niż te, do których się odnoszą (np. rys. 6.8). Zdarzają się również sporadyczne nieścisłości i nieprecyzyjne sformułowania w tekście, a niektóre fragmenty treści są powtórzone (wybrane przykłady poniżej). Uchybienia te nie umniejszają jednak merytorycznych walorów rozprawy.

Wstęp podzielony został na dwie główne części, z których pierwsza poświęcona jest obszernej charakterystyce pochodzenia i funkcji mikrogleju, natomiast druga stanowi przegląd metod sekwencjonowania, ze szczególnym uwzględnieniem technik wysokoprzepustowych i jednej technologii badań transkryptomicznych pojedynczych komórek. Część dotycząca mikrogleju jest ciekawa, klarowna i zawiera wyczerpujące informacje przygotowane na podstawie bogatego materiału źródłowego. Świadczy to o rozległej wiedzy teoretycznej Doktorantki i Jej bardzo dobrej znajomości aktualnej literatury przedmiotu. Cenne jest przedstawienie zarówno obecnego stanu wiedzy, jak i nakreślenie pytań oraz kierunków dalszych badań. Niewielkim niedociągnięciem jest tutaj powtarzanie niektórych informacji, na przykład na temat zmian morfologii mikrogleju czy jego roli w utrzymywaniu homeostazy. Druga część Wstępu zyskałaby na wartości, gdyby zamiast niskoprzepustowym technikom sekwencjonowania, które nie są ściśle powiązane z pracą, więcej miejsca poświęcono zastosowanej metodzie analizy ekspresji genów pojedynczych komórek, na przykład prezentując jej główne etapy na schemacie, bądź porównując ją z innymi dostępnymi technologiami. W tej części, w podrozdziałach 3.4.3 i 3.4.4 zabrakło odniesień do źródeł, z których pochodzą prezentowane informacje. Ponadto, ostatni akapit podrozdziału 3.4.4 powinien znaleźć się w podrozdziale 3.4.5. W ogólnym ujęciu, druga część Wstępu mogłaby zostać nieco dopracowana, lecz spełnia swoją funkcję i wprowadza czytelnika w tematykę podejmowaną w rozprawie.

Głównym celem rozprawy było zrozumienie pochodzenia i cech funkcjonalnych mikrogleju odtworzonego po jego farmakologicznej eliminacji, ze szczególnym uwzględnieniem różnic między myszami młodymi i w okresie starzenia. Dla osiągnięcia tego celu Doktorantka podjęła się realizacji sześciu zadań szczegółowych, z których większość jest w pełni uzasadniona i jasno sformułowana. Zadanie szóste, obejmujące, w dosłownym tłumaczeniu „porównanie aktywowanego mikrogleju w różnych stanach patologicznych oraz w publicznych zbiorach danych” (*„Comparison of activated microglia in various pathologies and in public datasets”*) zostało jednak ujęte w sposób nieprecyzyjny, co może rodzić pewne wątpliwości co do jego zakresu.

Rozdział Materiały i Metody przedstawia opisy części eksperymentalnej i bioinformatycznej przeprowadzonych badań. Układ treści w tym rozdziale jest charakterystyczny dla publikacji w czasopiśmie naukowych, odbiegając tym samym od formy zwyczajowo przyjętej dla rozpraw doktorskich w formie monografii. Przyjęcie takiego układu wydaje się jednak uzasadnione w kontekście faktu, że doświadczenia zostały wykonane przez inne osoby (ich nazwiska wymieniono w rozprawie), a Doktorantka była odpowiedzialna za analizy bioinformatyczne. Niestety jednak opisy części doświadczalnej zawierają pewne nieścisłości, które początkowo utrudniają zrozumienie założeń prowadzonych prac. Na przykład, na stronie 42 można znaleźć informację, że w badaniach wykorzystano samce i samice myszy młodych (*„young”*, 3 m-ce), starzejących się (*„aging”*, 12 m-cy) i starych (*„aged”*, 18-22 m-cy), natomiast rysunek uwzględnia tylko samice w wieku 3 i 12 m-cy, przy czym te ostatnie określone są słowem „stare” (*„old”*).

Dopiero z opisu na stronie 45 wynika, że użyto osobników w wieku 3 i 12 m-cy, bez wskazania ich płci. Odnosząc się do tej kwestii, proszę Doktorantkę o wyjaśnienie dlaczego dokonano takiego wyboru i w jaki sposób objęcie badaniami również myszy w wieku 18-22 m-cy mogłoby wpłynąć na uzyskane rezultaty. Proszę również o komentarz w jak dużym stopniu badane zjawisko odnowy mikrogleju kształtowane jest czynnikami zależnymi od płci zwierzęcia. Opis części doświadczalnej zawiera także drobniejsze błędy, takie jak np. stwierdzenie, że analizę jakości całkowitego RNA wykonano zarówno w przypadku sekwencjonowania klasycznego, jak i ukierunkowanego na pojedyncze komórki (str. 46).

Część rozdziału poświęcona analizom danych szczegółowo i precyzyjnie opisuje warsztat badawczy Doktorantki. Sposób przedstawienia metodyki bioinformatycznej, wraz z uzasadnieniem i omówieniem poszczególnych etapów postępowania, potwierdza bardzo dobrą znajomość i zrozumienie zastosowanych narzędzi. Niektóre rozważania wręcz wykraczają poza zakres typowego opisu metod. Nawiązując do wymienionych na stronie 48 strategii normalizacji dostępnych w pakiecie Seurat, proszę o wskazanie, która z nich mogłaby być z powodzeniem zastosowana jako alternatywa wobec wybranej metody *LogNormalize*. Doktorantka podała konkretne wartości parametrów liczby najbliższych sąsiadów czy rozdzielczości klastrowania (str. 50). Czy były testowane różne wartości tych parametrów, a jeśli tak, jakie kryteria decydowały o ostatecznym wyborze?

Rozdział Wyniki stanowi najobszerniejszą część rozprawy i prezentuje wysoki poziom naukowy. W pierwszym etapie Doktorantka przeprowadziła analizę danych sekwencjonowania transkryptomów pojedynczych komórek i zaprezentowała globalny wynik klastrowania w postaci projekcji UMAP. Następnie na rysunku 6.5 przedstawiła tę samą projekcję, w której uwidoczniła udział każdej próbki osobno, zabrakło tutaj jednak próbki „rep 4 HTO2”. W tym kontekście, proszę o podanie liczby komórek przypadających na każdą próbkę (ostateczna liczba po filtrowaniu) oraz o komentarz na temat poziomu zmienności poszczególnych próbek w obrębie replikatów. W kolejnym etapie Doktorantka porównała mikroglej odtworzony po farmakologicznym usunięciu z mikroglejem w warunkach kontrolnych u młodych myszy. Co ciekawe, analizy te wykazały pojawienie się w odtworzonym mikrogleju w stanie aktywowanym, przypominających mikroglej związany z nowotworami mózgu. Pozwoliły także zidentyfikować klastery mikrogleju proliferującego i niedojrzałego, przy czym ten ostatni wykazywał podwyższoną ekspresję genów związanych z odpowiedzią zapalną. Wyodrębnienie tych klastrów pozwoliło na rekonstrukcję trajektorii o charakterze ciągłym, rozpoczynającą się od proliferującego mikrogleju, przechodzącą przez stany aktywowane i prowadzącą do odtworzenia mikrogleju o cechach typowych dla stanu homeostazy. W dalszej części pracy Doktorantka sprawdziła, czy proces ten kształtuje się tak samo w okresie starzenia się zwierząt. Zidentyfikowała szereg zmian w jego przebiegu i dogłębnie scharakteryzowała je na poziomie transkryptomowym, łącząc dane uzyskane z wysokoprzepustowego sekwencjonowania ukierunkowanego na pojedyncze komórki i klasycznego. Doktorantka zaobserwowała kumulację mikrogleju proliferującego i w stanach aktywowanych, co skutkowało brakiem efektywnego odtwarzania stanu homeostazy. U starych osobników mikroglej wykazywał podwyższoną ekspresję genów związanych z procesami zapalnymi i neurodegeneracyjnymi. Zdając sobie sprawę ze złożoności omawianych zagadnień, chciałabym poznać opinię Doktorantki na temat tego, jakie czynniki mogą w głównej mierze decydować o tym, że u młodych osobników odpowiedź zapalna ma charakter przejściowy, natomiast u starszych się utrzymuje. Czy są one związane z interleukiną 33? Bardzo ciekawych spostrzeżeń dostarcza część Wyników dotycząca podobieństw między aktywowanymi stanami mikrogleju odtworzonego a mikroglejem związanym z glejakami, gdzie ekspresji ulegają geny zaangażowane w procesy migracji, fagocytozy i odpowiedzi zapalnej. Do tej części mam następujące pytania. W tabeli 6.3

wymieniono geny markowe poszczególnych podtypów aktywowanego mikrogleju, a następnie poziomy ekspresji markerów dla Act-MG1 przedstawiono na rysunku 6.17A. Czy nie należałoby oczekiwać wysokiego poziomu ekspresji tych genów w dużym odsetku komórek należących do tego klastra, aby można było uznać je za jego markery? Jak należy interpretować poziom ekspresji tych genów w podtypie Act-MG1 w porównaniu do podtypów MG2 i MG3?

Dyskusja jest podzielona na podrozdziały odpowiadające układowi Wyników. Ta część rozprawy została opracowana starannie, w sposób świadczący o dojrzałym podejściu Doktorantki do interpretacji rezultatów własnych badań i analizy materiałów źródłowych. Stanowi ciekawe i wyczerpujące opracowanie. Dyskusja jest zakończona nakreśleniem ograniczeń przeprowadzonych badań. Wśród nich Doktorantka dostrzega m.in., że przedstawione w pracy wyniki dotyczą transkryptomu, stąd też nie dostarczają informacji o funkcjach białek. Można byłoby w tym miejscu wspomnieć, że nie odnoszą się też do niekodujących RNA, których potencjalny udział w badanym procesie jest również wart uwagi. Oczywiście wynika to wyłącznie z ograniczeń współczesnych technologii ukierunkowanych na badania transkryptomyczne pojedynczych komórek.

Rozprawa jest zakończona wymienionymi w punktach wnioskami, które są w pełni uzasadnione w kontekście przedstawionych wyników badań.

Podsumowując stwierdzam, że Doktorantka posiada rozległą wiedzę teoretyczną i umiejętność jej wykorzystania. W przemyślany sposób zaplanowała poszczególne etapy pracy, a wykonując je wykazała się biegłością w stosowaniu zaawansowanych narzędzi analitycznych. Jasno opisała uzyskane rezultaty, a następnie kompetentnie je przedyskutowała i poprawnie sformułowała wnioski. Dowodzi to faktu, że Doktorantka wykazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Oceniana rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu o dużym znaczeniu dla współczesnej biomedycyny. Dzięki zastosowaniu transkryptomiki pojedynczych komórek możliwe było scharakteryzowanie nowych stanów mikrogleju podczas jego odtwarzania, a także opisanie dynamiki tego procesu i jej zmian zależnych od wieku. Stanowi to ważny wkład w zrozumienie molekularnego podłoża zjawiska odnowy mikrogleju.

Biorąc pod uwagę wymienione wyżej przesłanki stwierdzam, że 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 inż. Patrycji Rosy do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Paulina Jackowiak



Kraków 10.02.2026

**Prof. dr hab. n. med. Joanna Mika
Zakład Farmakologii Bólu
Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja
Polskiej Akademii Nauk**

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr inż. Patrycji Rosy zatytułowanej

**„Understanding of processes driving microglia repopulation
in young and old mice by applying scRNA-seq technology”**

Przedstawiona do oceny praca doktorska Pani mgr inż. Patrycji Rosy wykonana pod kierunkiem Promotora Pani prof. dr hab. Bożeny Kamińskiej-Kaczmarek oraz Promotora pomocniczego Pana dr Aleksandra Jankowskiego bardzo dobrze wpisuje się w tematykę badawczą Pracowni Neurobiologii Molekularnej, Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego Polskiej Akademii Nauk w Warszawie. Badania zespołu od lat koncentrują się wokół immunologii nowotworów, ze szczególnym uwzględnieniem roli mikrogleju. Co ważne, wyniki dowodzą kluczowej funkcji mikrogleju w kształtowaniu połączeń między neuronami oraz jego unikatowej roli w praktycznie wszystkich stanach patologicznych mózgu. Co wyjątkowe, wykazują, że w zależności od bodźca mikroglej może włączać lub wyłączać określone funkcje, aktywując różne programy ekspresji genów. Dzięki postępom w technologiach sekwencjonowania możliwe jest obecnie efektywniejsze badanie ekspresji genów na poziomie pojedynczych komórek. Doktorantka w swojej pracy słusznie zwraca uwagę na to, że w odróżnieniu od pozostałych komórek ośrodkowego układu nerwowego to mikroglej ma niezwykłą zdolność do odnowy. Jednakże zrozumienie złożoności zachodzących procesów wciąż wymaga wnikliwych badań. Pozostaje między innymi do wyjaśnienia, czy mikroglej odzyskuje pełną heterogeniczność funkcjonalną, a także czy jest to zależne od wieku organizmu. W świetle powyższych danych, tematyka przedstawionej do oceny pracy doktorskiej wydaje się bardzo trafna, ponieważ jej celem było zrozumienie pochodzenia i funkcjonalności odnowionego mikrogleju po jego farmakologicznym usunięciu, ze szczególnym uwzględnieniem różnic pojawiających się w procesie starzenia.

Praca napisana została w języku angielskim, zawiera 114 stron, 25 rycin oraz 4 tabele. Składa się z typowych rozdziałów takich jak: Wykaz skrótów, Streszczenie w języku angielskim i polskim, Wprowadzenie, Cel, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski końcowe, Bibliografia oraz Lista dorobku naukowego Kandydatki. Badania zostały przeprowadzone w ramach 2 projektów typu Opus 2020/39/B/NZ4/02683 pod kierunkiem Promotora oraz Sonata 2020/39/D/NZ2/03461 pod kierunkiem Promotora pomocniczego finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki, ponadto część badań została przeprowadzona w ramach programu „Polskie Powroty 2019”. Co warto zaznaczyć, w 2024 roku już część wyników została opublikowana przez Doktorantkę w czasopiśmie *Journal of Neuroinflammation* w pracy pt. **“Tracking changes in functionality and morphology of repopulated microglia in young and old mice”**. Pragnę podkreślić, że logiczny układ pracy doktorskiej, dojrzałe opracowanie, poprawny styl, właściwe cytowanie literatury, a także sposób dyskusji wyników wskazuje na dobrze opanowaną przez Doktorantkę umiejętność pracy naukowej.

We Wprowadzeniu, na 27 stronach, Doktorantka w sposób syntetyczny omawia znaczenie i stany transkrypcyjne mikrogleju, ze szczególnym uwzględnieniem jego roli w utrzymaniu homeostazy w ośrodkowym układzie nerwowym, a także zaangażowania zarówno w rozwój jak i proces starzenia się mózgu. Dokonuje również wnikliwego przeglądu literaturowego omawiając pochodzenie i funkcjonalności odnowionego mikrogleju po jego wcześniejszym farmakologicznym usunięciu, poświęcając sporo uwagi jego morfologii, tożsamości transkryptomowej oraz heterogeniczności. W następnej części pokrótce przedstawia przyszłe kierunki badań nad rolą mikrogleju w zdrowiu i chorobie. Natomiast w ostatniej części tego rozdziału Doktorantka bardzo wnikliwie omawia dostępne dane literaturowe dotyczące zastosowanej zaawansowanej w badaniach metodologii.

W kolejnym rozdziale Kandydatka przedstawia główne założenia oraz w 6 punktach szczegółowe - bardzo ambitne - cele, realizowane w ramach rozprawy doktorskiej. Obejmowały one określenie heterogeniczności i porównanie mikrogleju w czasie odnowy na poziomie transkrypcyjnym i funkcjonalnym u młodych i starych myszy z wykorzystaniem danych z sekwencjonowania RNA masowego (bulk RNA seq), jak i pojedynczych komórek (scRNA-Seq). Ponadto, porównanie czy aktywacja odnowionych komórek jest podobna do tej obserwowanej w stanach patologicznych zarówno podczas rozwoju glejaka, jak i zaburzeń neurodegeneracyjnych.

W rozdziale Materiały i metody Autorka zawarła najważniejsze informacje dotyczące sposobu prowadzenia eksperymentów i analizy wyników. Na uznanie zasługuje bogaty

warsztat metodyczny, a także umiejętność współpracy z badaczami w kraju i za granicą. Co ważne, Doktorantka udokumentowała, że badania były prowadzone za zgodą I Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach w Warszawie (*numery uzyskanych zgód - 836/2019 i 1364P1/2022*).

W rozdziale Wyniki Doktorantka prezentuje przejrzyste dane uzyskane w swoich eksperymentach na 18 bardzo rozbudowanych rycinach oraz w postaci 3 tabel. Logicznie zaplanowane eksperymenty i konsekwentna ich realizacja przyniosły efekty w postaci klarownie opisanych i graficznie przedstawionych wyników. W badaniach dokonano farmakologicznego usunięcia mikrogleju u młodych i starych myszy przy użyciu BLZ-945 czyli inhibitora CSF1R, a następnie przeprowadzono sekwencjonowanie RNA pojedynczych komórek w populacji komórek mieloidalnych sortowanych jako komórki CD11b⁺. W badaniach wykazano, że po 21 dniach podawania BLZ-945 następuje całkowita eliminacja mikrogleju, ale już w ciągu 7 dni od jego odstawienia dochodzi do stopniowej odnowy populacji tych komórek. Heterogeniczność funkcjonalną odnowionego mikrogleju badano za pomocą analizy scRNA-seq. Dowiedziono, że odtworzony mikroglej uzyskuje stan transkrypcyjny obserwowany u zwierząt kontrolnych, ale wcześniej przechodzi przez przejściowe stany aktywacji, które scharakteryzowano jako 3 typy Act-MG1, Act-MG2 i Act-MG3. Te wyjątkowe stany odzwierciedlają dynamiczną plastyczność mikrogleju i charakteryzują się ekspresją genów związanych z proliferacją (*Mki67*, *Top2a*), migracją i przebudową cytoszkieletu (*Rac1*, *P2ry12*) oraz degradacją macierzy pozakomórkowej (*Cstb*, *Ctsd*). Moją uwagę przykuły dane pokazujące bardzo wysokie poziomy ekspresji genów związanych z cytokinami (*Ccl2*, *Ccl3*, *Ccl4*, *Cxcl10*, *Tnf*, *Il-1beta*) zaobserwowane jedynie w odtworzonej populacji mikrogleju u starzejących się myszy. Rezultaty te są nowatorskie i wskazują, że chociaż odtworzone komórki mikrogleju u starszych myszy częściowo przywracają swój fenotyp homeostatyczny, to jednak utrzymuje się u nich podwyższony stan zapalny, co z wiekiem może przyczyniać się do upośledzenia funkcji tych komórek. Bardzo ciekawym wynikiem jest również ten pokazujący, iż w odnowionym mikrogleju pochodzącym z mózgów starszych myszy dochodzi do zwiększonej ekspresji genów proapoptotycznych (*Lmnbl*, *Casp8*, *Psmid3* i *Bak1*). Uzyskane dane jednoznacznie wskazują, że starzenie jest kluczowym czynnikiem determinującym efektywność odnowy mikrogleju. Również przeprowadzone przez Autorkę masowe sekwencjonowanie RNA (bulk RNA-seq) potwierdziło, że z wiekiem dochodzi zarówno do obniżenia ekspresji genów homeostatycznych (*Tmem119*, *P2ry12*, *Trem2*), jak i zwiększenia wielu proapoptotycznych (*Bik*, *Bad*, *Bid*, *Bax*, *Bcl2*, *Bcl2l1*, *Cyts*, *Apaf1*, *Casp9*, *Fas*, *Casp8*). Co niezwykle ciekawe dalsze analizy szlaków

powiązanych z ekspresją genów wskazały na zaburzenia w procesie starzenia w osi RhoA-ROCK, która jest kluczowa dla aktywacji, migracji i polaryzacji mikrogleju oraz przyczynia się do wywołania reakcji zapalnej. Za ważne i nowatorskie uważam również wykazanie podobieństw między stanami aktywacji odnowionego mikrogleju u starych myszy a tymi opisanymi w opublikowanych zbiorach danych mikrogleju w przebiegu glejaka, a także choroby Alzheimera i stwardnienia rozsianego. Doktorantka między innymi wykazała wspólne programy transkrypcyjne, a także to, że odnowiony mikroglej zwłaszcza u młodych myszy zmierza w kierunku homeostazy, podczas gdy ten związany z glejakiem jest ukierunkowany w stronę trwałej aktywacji i fagocytozy. Na uznanie zasługuje zarówno staranne przeprowadzenie badań, jak i oryginalne podejście eksperymentalne. Pragnę również podkreślić, że wyniki eksperymentów zostały już częściowo opublikowane w pracy oryginalnej, przygotowanej pod kierunkiem zarówno Promotora jak i Promotora pomocniczego. Uwagę zwraca również fakt, że praca została przygotowana w ramach międzynarodowej współpracy z naukowcami z Niemieckiego Centrum Chorób Neurodegeneracyjnych w Bonn.

Niezwykłe cenną częścią dysertacji, świadczącą o dojrzałości naukowej Doktorantki jest Dyskusja, w której zwraca uwagę spójna interpretacja wyników, a także odniesienie ich do bogatej literatury (zamieszczono 247 pozycji piśmiennictwa). W pierwszej części Doktorantka w ciekawy sposób dyskutuje przywrócenie heterogeniczności funkcjonalnej mikrogleju po jego odnowieniu u młodych myszy. Natomiast w drugiej dowodzi, że proces starzenia niestety znacząco zakłóca proces odnowy mikrogleju uniemożliwiając przywrócenie pełnej homeostazy. Ostatnia część dyskusji jest szczególnie interesująca, Autorka wykazuje w niej, że aktywowany mikroglej w mikrośrodkowisku glejaka wykazuje podobne programy transkrypcyjne do odtworzonego aktywnego mikrogleju, co sugeruje wspólną pulę genów leżącą u podstaw tych złożonych procesów. Jak wiele jeszcze pozostaje do ustalenia, przedstawiła Autorka w części poświęconej ograniczeniom badań. Określenie złożoności procesu odnowy mikrogleju w ośrodkowym układzie nerwowym jest niezmiernie istotne również z klinicznego punktu widzenia. Dlatego też, w mojej ocenie uzyskane wyniki mogą przyczynić się do opracowywania skuteczniejszych strategii terapeutycznych w leczeniu wielu chorób o podłożu neurodegeneracyjnym. Dysertacja zakończona jest 5 głównymi wnioskami, w których Doktorantka trafnie podsumowuje rezultaty swoich badań. W ostatnim rozdziale Kandydatka wykazała, że jest współautorką 3 publikacji, co świadczy o umiejętności współpracy zarówno krajowej, jak i co ważne międzynarodowej, a także o jej zaangażowaniu w pracę naukową.

Mimo bardzo dobrej pracy, Doktorantka nie uniknęła drobnych niedociągnięć. Brakuje jednoznacznie określonej całkowitej liczby zwierząt użytych w przeprowadzonych eksperymentach, a zwłaszcza informacji o ich płci. W podrozdziale 5.1 Autorka podaje, że prowadziła badania na samcach i samicach, jednakże schemat eksperymentalny Ryc. 5.1 sugeruje, że badania farmakologiczne prowadzone były jedynie na samicach, a w rozdziale 6 dotyczącym wyników badań kwestia płci jest już całkowicie pominięta. Obecnie pojawia się coraz więcej informacji o istotnych różnicach w funkcji mikrogleju związanych z płcią, dlatego prosiłabym o wyjaśnienie tej kwestii i odniesienie się do dostępnej literatury.

Podsumowując, przeprowadzone badania wymagały solidnego warsztatu metodycznego, umiejętności współpracy, a także nakładu pracy Doktorantki. Dowiedziono, że chociaż mikroglej u młodych myszy odtwarza pełną różnorodność i funkcjonalność, to jednak u starych proces ten jest zaburzony co uniemożliwia przywrócenie pełnej homeostazy. Określenie przez Autorkę wspólnych programów aktywacji, które łączą odnowę mikrogleju z jego patologiczną aktywacją niewątpliwie poszerza perspektywy terapeutyczne. Omówione wyżej drobne niedociągnięcia nie umniejszają wartości przedstawionej do recenzji dysertacji. Z przyjemnością, zatem pragnę stwierdzić, że rozprawa doktorska autorstwa Pani mgr inż. Patrycji Rosy zatytułowana „*Understanding of processes driving microglia repopulation in young and old mice by applying scRNA-seq technology*” spełnia wymagania stawiane rozprawie doktorskiej przez Ustawę z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2024 r. poz. 1571 z późn. zm.), dlatego mam zaszczyt wnosić do Wysokiej Rady Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego Polskiej Akademii Nauk w Warszawie o dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora. Jednocześnie, z uwagi na rangę podjętej tematyki, ogólną wiedzę teoretyczną, kompetencje Doktorantki w zakresie umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, nowatorski charakter podjętej tematyki badawczej, sprawność prowadzenia interesującej dyskusji oraz znaczenie uzyskanych wyników dla rozwoju badań nad mikroglejem, a także fakt iż dane zostały już częściowo opublikowane w renomowanym czasopiśmie zwracam się z wnioskiem do Wysokiej Rady o wyróżnienie rozprawy doktorskiej, wykonanej pod kierownictwem naukowym dwóch Promotorów, Pani prof. dr hab. Bożeny Kamińskiej-Kaczmarek i Pana dr Aleksandra Jankowskiego.


Prof. dr hab. n. med. Joanna Mika

Dr hab. inż. Paweł Piotr Łabaj, prof. UJ
Małopolskie Centrum Biotechnologii
Uniwersytet Jagielloński
Gronostajowa 7a, 30-387 Kraków
pawel.labaj@uj.edu.pl

Kraków, 18.02.2026

Recenzja rozprawy doktorskiej

Tytuł rozprawy: Understanding of processes driving microglia repopulation in young and old mice by applying scRNA-seq technology

Autor rozprawy: Mgr inż. Patrycja Rosa

Promotor rozprawy: Prof. dr hab. Bożena Kamińska-Kaczmarek

Promotor pomocniczy rozprawy: Dr Aleksander Jankowski

Rozwój wysokoprzepustowych biomedycznych technik pomiarowych pozwolił w ostatnich latach na znaczny postęp w naukach biologicznych i medycznych. Szczególne przyspieszenie nastąpiło w związku z rozwojem Next Generation Sequencing (NGS) i technik pochodnych. Jednym z przykładów jest zastosowanie NGS do ilościowej oceny ekspresji genów i ich alternatywnych transkryptów. Domyślną strategią jest charakteryzacja transkryptomu w populacjach komórek pochodzących z określonej tkanki (ang. bulk RNAseq). To podejście jest motywowane założeniem, że komórki z tego samego typu tkanki są jednorodne i jednocześnie takie podejście jest historycznie odziedziczone po technikach nisko-przepustowych oraz mikromacierzowych. W rezultacie uzyskane wyniki są swego rodzaju średnią ważoną z różnych profili ekspresji z badanej populacji komórek. Podejście to bardzo dobrze sprawdza się w ogólnej charakteryzacji tkanki, jednak w szczególnych przypadkach, gdzie interesujący nas sygnał nie pochodzi od dominującej grupy komórek, jest niewystarczające. Alternatywnym podejściem jest sekwencjonowanie RNA pojedynczych komórek (scRNA-Seq), które pod względem technologicznym dynamicznie rozwija się w ostatnich latach. W tym podejściu co do zasady uzyskujemy profile ekspresji dla każdej komórki z osobna, co pozwala na rozróżnienie nie tylko pod względem typu komórki ale także ich fazy „cyklu życia”.

Jednak analiza danych pochodzących z eksperymentów scRNA-Seq jest trudnym zadaniem, znacznie trudniejszym niż z „klasycznego” RNA-Seq (bulk RNA-Seq). Z jednej strony musimy mierzyć się z wysoką wymiarowością danych, a z drugiej z szumem o złożonej etiologii. W typowym eksperymencie scRNA-Seq dla każdej próbki dla dziesiątek a nawet setek tysięcy komórek mierzymy poziomy ekspresji dla setek tysięcy alternatywnych transkryptów genów (często dla uproszczenia sumowanych do poziomu genów, co wiąże się z utratą części informacji). Jednocześnie cały proces generacji danych jest złożony z wielu etapów, gdzie na każdym sygnał może ulec zaszumieniu. Do tego oczywiście dochodzą ograniczenia i charakterystyka samej technologii

sekwencjonowania. Na całość nakłada się także charakterystyka biologiczna: z naturalną, stochastyczną różnicą w sygnałach pomiędzy komórkami tego samego typu, różnicą między typami komórek, jak i różnicą wynikająca z fazy „cyklu życia” danej komórki. Większość z tych składowych jest też obecna w danych z eksperymentów typu „bulk RNA-Seq”, jednak większa złożoność przygotowania próbki jak i dodatkowy wymiar złożoności w postaci dziesiątek/setek tysięcy komórek powoduje, że analiza tego typów danych jest trudniejsza zarówno ze względu na bardziej złożony szum jak i większą wymiarowość danych w stosunku do klasycznego RNA-Seq.

W przedstawionej do oceny rozprawie doktorskiej oba podejścia sekwencjonowania (scRNA-seq oraz bulk RNA-seq) zostały wykorzystane w celu uzyskania komplementarnego, wielopoziomowego obrazu zmian zachodzących w mikrogleju podczas procesu repopulacji. Połączono je aby zniwelować ich indywidualne ograniczenia skupiając się na mocnych stronach danego podejścia, dzięki temu scRNA-seq dało wgląd w strukturę populacji i procesy różnicowania, natomiast bulk RNA-seq zapewniło głębszą analizę molekularną i potwierdzenie statystyczne obserwowanych zmian w ekspresji genów, szczególnie w kontekście starzenia.

Wchodząc głębiej głównym celem użycia scRNA-seq było zbadanie heterogenności (różnorodności) populacji mikrogleju, której nie można uchwycić tradycyjnymi metodami uśredniającymi wynik dla całej populacji komórek. A dokładniej: i) Identyfikacja subpopulacji i stanów przejściowych: użycie scRNA-Seq pozwoliło na wykrycie rzadkich i przejściowych stanów aktywacji mikrogleju (np. Act-MG1, Act-MG2, Act-MG3), które pojawiają się tylko w trakcie repopulacji i nie występują w mózgu kontrolnym, ii) Analiza trajektorii rozwojowych: Dzięki scRNA-seq możliwe było przeprowadzenie tzw. trajektorii inference (wnioskowania o trajektorii), co pozwoliło ustalić, że odnawiający się mikroglej pochodzi od proliferujących prekursorów, przechodzi przez stany aktywacji, a następnie dąży do stanu homeostatycznego, iii) Porównanie młodych i starych osobników na poziomie komórkowym: scRNA-Seq umożliwiło wykazanie, że u starych myszy proces dojrzewania mikrogleju jest zaburzony (komórki te zatrzymują się w stanach aktywowanych i nie w pełni odtwarzają populację homeostatyczną, co byłoby trudne do precyzyjnego określenia w badaniu całej tkanki), iv) Charakterystyka profilu transkrypcyjnego: Pozwoliła na stworzenie kompleksowego atlasu stanów transkrypcyjnych mikrogleju w kontekście jego regeneracji.

Natomiast Bulk RNA-seq wykorzystano jako metodę uzupełniającą i walidującą, szczególnie w kontekście badań nad starzeniem się mikrogleju. A dokładniej: i) Zwiększenie siły statystycznej i głębokości sekwencjonowania: metoda ta posłużyła do wygenerowania danych o wysokiej rozdzielczości z większą mocą statystyczną, co pozwoliło na wykrycie genów różnicujących (DEG) oraz szlaków sygnałowych, które mogły zostać przeoczone w scRNA-seq ze względu na jego ograniczone pokrycie (tzw. dropout effects), ii) Potwierdzenie mechanizmów w starym mikrogleju: Bulk RNA-seq wykorzystano specyficznie do potwierdzenia, że w odnowionym mikrogleju starych myszy dochodzi do obniżenia ekspresji kluczowych genów homeostatycznych (np. P2ry12, Tmem119) oraz wzrostu ekspresji genów związanych z apoptozą i starzeniem, iii) Analiza szlaków molekularnych: Bulk RNA-Seq umożliwiło precyzyjniejsze wskazanie deregulacji konkretnych szlaków, takich jak szlak RhoA-ROCK czy szlaki związane ze śmiercią komórkową, co potwierdziło, że "stary" mikroglej jest bardziej podatny na apoptozę.

Układ rozprawy jest typowy dla tego typu opracowań. W kolejnych rozdziałach Autorka:

- przybliża pochodzenie i znaczenie mikroglegu jak również opisuje proces usuwania i repopulacji. Przedstawia też możliwe przyszłe kierunki badań oraz omawia typowe techniki badań i metody analizy (Rozdział 3),
- przedstawia cele pracy (Rozdział 4),
- przedstawia koncept badania, zastosowaną metodologię jak i sposób analizy danych (Rozdział 5),
- prezentuje wyniki poszczególnych analiz realizujących założone cele pracy (Rozdział 6)
- prezentuje dyskusję uzyskanych wyników (Rozdział 7)
- prezentuje podsumowanie w formie zdefiniowanych konkluzji (Rozdział 8)

Należy podkreślić, że w rozdziale 3. Autorka bardzo dokładnie omawia obecny stan wiedzy co świadczy o dużym odczytaniu i dobrym przygotowaniu do podjęcia zagadnień poruszanych w dalszych częściach pracy. Sekcje wprowadzenia opisujące pochodzenie, funkcje, znaczenie mikroglegu jak i później procesy usuwania i repopulacji są wręcz wzorcowe. Trochę zamieszania pojawia się natomiast w sekcji 3.4 skupiającej się na klasyfikacji obecnie używanych technologiach pomiarowych. Takim rzucającym się w oczy przykładem jest uwzględnienie ONT zarówno w grupie technologii nisko- jak i wysoko-przepustowych. Podobnie jest z kwestią sekwencjonowania celowanego. Należałoby tutaj rozróżnić, że niektóre technologie są jedynie nisko-przepustowe. Natomiast technologie co do zasady wysokoprzepustowe są stosowane w wachlarzu urządzeń gdzie przepustowość jest dostosowana do zastosowania (Illumina: iSeq, MiSeq, NextSeq, NovaSeq ...; ONT: MinION, GridION, PromethION). A drugą kwestią jest ilość otrzymywanych danych na próbkę. W sekwencjonowaniu celowanym (amplicon albo probe based) celowo skupiamy się na wybranych „celach” przez co dla danej próbki ilość odczytów będzie niższa, ale najczęściej dla danego urządzenia oznacza to zwiększenie ilości próbek multipleksowanych i sekwencjonowanych razem.

Następnie w rozdziale 5. opisującym koncept badania, zastosowaną metodologię jak i sposób analizy danych niestety jest widoczny dalszy spadek jakości pracy. Brakuje schematu wyjaśniającego całość badania oraz analiz, który jasno by pokazywał jakie dane są generowane, jakie metody są użyte i które elementy analizy są powiązane z osiągnięciem konkretnych celów. Tych celów jest aż sześć, są one co do zasady komplementarne, ale przejście narracyjne z jednego do kolejnego nie jest tak oczywiste.

Należy też zwrócić uwagę, że w rozdziale tym jest dość znaczne nieuporządkowanie i występuje trochę błędów merytorycznych:

- W podsekcji 5.2.3 tekst na stronie 44 jest znaczeniowo tożsamy z tym na stronie 45
- W sekcji 5.3 znowu pojawia się informacja o sekwencjonowaniu scRNA-Seq, ale tym razem jest to: **2×76 bp on the HiSeq 1500**, gdzie wcześniej to było: **paired-end sequenced (read 1–26 bp, read 2–100 bp) on a HiSeq 1500**
- W podsekcji 5.6.2 Autorka pisze „*We employed methods originally designed for bulk expression samples such as edgeR*” ale później nie korzysta z

funkcjonalności edgeR dedykowanej dla analizy scRNA-Seq. Ponadto nie korzysta z zalecanej normalizacji TMM, która natywnie jest częścią edgeR, mimo, że jest ona stosowana później do bulk RNA-Seq. Wspomina też słusznie, że po korekcji wielokrotnego testowania geny różnicujące są wybierane z zastosowaniem progów dla istotności statystycznej i siły sygnału, tylko, że nie jest podany zastosowany próg dla istotności statystycznej

- W sekcji 5.7 (dotyczącej już bulk RNA-Seq) stosowane jest połączenie **edgeR** (do normalizacji) z **limma** (do identyfikacji DEG), co jest jedną z możliwych opcji. Natomiast brakuje dyskusji o wpływie wyboru metod na stabilność wyników. A co najistotniejsze niezrozumiałe jest używanie różnych podejść (pod kątem modelowania sygnału) dla danych scRNA-Seq i bulk RNA-Seq gdzie istnieją metody umożliwiające analizę obu typów (jak wspomniany edgeR). Poprawiłoby to jakość i siłę wnioskowania w obszarach gdzie wyniki z obu metod są zestawiane. W tej sekcji niezrozumiały jest też fragment: „we applied false discovery rate (FDR) correction to the resulting *p*-values to control for multiple testing”. Mamy rodzinę metod do korekcji które kontrolują FDR, jedną z nich jest *Benjamini-Hochberg*, użyta przy analizie scRNA-Seq. Zakładam, że tutaj użyta była ta sama metoda, która jest domyślna w **limma** jako przedstawiciel rodziny kontrolującej FDR i ma w kodzie **limma** alias „fdr”. Ale nie jest to nazwa metody/procedury.

Całościowo cały ten rozdział jest chaotyczny, a powyższe uwagi szczegółowe dotyczą jedynie obszarów w których czuję się kompetentny.

Niestety w rozdziale 6. gdzie przedstawione są wyniki nie jest lepiej. Nie ma całościowej narracji, która by pomogła przejść po poszczególnych wynikach i jednoznacznie wykazać osiągnięcie założonych celów. Wygląda to trochę jak zbiór nie powiązanych ze sobą bardzo złożonych figur. Nie jestem w stanie ocenić jak te figury zostały uzyskane i któremu kawałkowi analizy odpowiadają (brak schematu prezentującego całość analiz dla wszystkich sześciu celów).

Skupiając się na przykład na wynikach analizy bulk RNA-Seq i figurze 6.13 w opisie wyników znajdziemy „As illustrated in the volcano plot (Fig. 6.13A), numerous DEGs were identified”, ale nie ma informacji ile DEG tutaj mamy? Być może są to wartości podane w sekcji 5.7 „This analysis yielded 736 differentially expressed genes, with 453 upregulated and 283 downregulated in the repopulated group compared to controls.”, ale wtedy należy przyjąć, że “Genes were considered significantly differentially expressed if they had an absolute log2 fold change ($|\log_2FC|$) > 1 and an adjusted *p*-value ≤ 0.05 .”. Niestety przyglądając się 6.13 A) szacuję, że próg dla **$|\log_2FC|$ to jest ~0.05**, a dla ***p*-value to jest 10^{-5}** , czyli wartości zupełnie odmienne niż te podane wcześniej. Osobną kwestią jest niska użyteczność volcano-plot, gdyż podświadomie skupia uwagę na DEG o wysokiej istotności statystycznej, gdzie istotność statystyczna powinna być jedynie użyta do odrzucenia nieistotnych genów, a sama ocena ważności powinna opierać się na sile i stabilności sygnału. Taką szansę daje M(A)-plot. Co ciekawe w dalszej analizie Autorka właśnie tak postępuje, skupiając się na 50 genach o największej sile sygnału. I teraz znowu rodzi się pytanie, czy na właściwych? Bo jeśli próg odcięcia dla *p*-value, zgodnie z 6.3 A), jest ustawiony na 10^{-5} na pewno nie wzięto pod uwagę co najmniej kilku genów o znacznej sile sygnału.

To co jednak należy podkreślić to ogrom zakresu analiz i całego projektu. W mojej ocenie jest tutaj materiał na dwa, a może nawet trzy prace doktorskie. Metody analityczne są co do zasady poprawne, ale jest dużo swego rodzaju niechlujności (wierzę, że jedynie w opisie i w generowanych figurach), co zakładam wynika właśnie z obszerności materiału. To czego brakuje w analizach to zejście poziom niżej, do alternatywnych transkryptów, bo dopiero tam wiele rzeczy by się uwydatniło. Ale wtedy całość byłaby już chyba ponad siły Doktorantki. Komentarz ten zostawiam do przemyślenia odnośnie poszerzenia zakresu planowanych dalszych badań.

Rozdział 7. czyta się już dobrze, widać już tutaj zebranie wyników w całość i ich interpretacja w kontekście założonych celów. Szkoda, że podobnie nie poprowadzono prezentacji wyników. W rozdziale 8. zwięźle przedstawiono kluczowe konkluzje.

Podsumowując i jednocześnie odnosząc się do wymaganych elementów oceny:

1) Czy rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora w określonej dyscyplinie albo dyscyplinach?

Moja ocena jest pozytywna. Jakość wprowadzenia jak i całość zastosowanych metod jednoznacznie wskazują, że Doktorantka prezentuje bardzo dużą ogólną wiedzę teoretyczną.

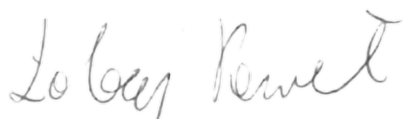
2) Czy rozprawa doktorska wykazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej lub artystycznej przez osobę ubiegającą się o nadanie stopnia doktora?

Moja ocena jest pozytywna. Zakres przeprowadzanej analizy i interpretacji wyników w połączeniu z wykazanymi „niedociągnięciami” jednoznacznie wykazują umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

3) Czy rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, oryginalne rozwiązanie w zakresie zastosowania wyników własnych badań naukowych w sferze gospodarczej lub społecznej albo oryginalne dokonanie artystyczne.

Moja ocena jest pozytywna. Wykorzystanie komplementarności bulk RNA-Seq i scRNA-Seq w połączeniu z zastosowaną metodyką analityczną stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Ale tutaj należy zaznaczyć, że to dopiero początek drogi.

Na podstawie powyższego stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska w pełni odpowiada warunkom stawianym w ustawie Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2024 r. poz. 1571 z późn. Zm.), w zakresie nadawania stopni naukowych i na tej podstawie wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN o dopuszczenie mgr inż. Patrycji Rosy do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.



Dr hab. inż. Paweł Piotr Łabaj, prof. UJ