



UNIwersytet
Warszawski



Wydział Biologii
Instytut Biologii Rozwoju i Nauk Biomedycznych
Zakład Cytoologii
dr hab. EDYTA BRZÓSKA-WÓJTOWICZ, prof. ucz.

Warszawa, 18.08.2023

Recenzja rozprawy doktorskiej pana mgr Piotra Rogujskiego pod tytułem:

„Modyfikacje mysich glejowo-specyficznych komórek progenitorowych z użyciem neureguliny-1 w celu zwiększenia ich potencjału regeneracyjnego w leczeniu chorób demielinizacyjnych ”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska pana mgr Piotra Rogujskiego pod tytułem: „Modyfikacje mysich glejowo-specyficznych komórek progenitorowych z użyciem neureguliny-1 w celu zwiększenia ich potencjału regeneracyjnego w leczeniu chorób demielinizacyjnych ” została wykonana pod opieką pani profesor Barbary Łukomskiej i doktor Luizy Stanaszek, w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego PAN. Rozprawa Kandydata jest pracą projektową i **spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim**, określone w artykule 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym.

Problem naukowy rozprawy

Pan mgr Piotr Rogujski prowadził badania dotyczące wpływu nadekspresji neureguliny-1 oraz traktowania komórek rekombinowanym peptydem neureguliny-1 na właściwości glejowo-specyficznych komórek progenitorowych. Zgodnie z danymi literaturowymi komórki te mogą mieć potencjalne zastosowanie we wspomaganie terapii chorób demielinizacyjnych, co wskazuje na dużą wagę prowadzonych badań. Doktorant ocenił możliwość wykorzystania wybranych wektorów lentiwirusowych i lentiwirusowych cząsteczek aktywacyjnych kodujących neuregulinę-1 typu I w celu indukcji jej nadekspresji w badanych komórkach. Przeprowadził również analizę różnicowania glejowo-specyficznych komórek progenitorowych traktowanych egzogennym rekombinowanym peptydem neureguliny-1. Badania Doktoranta prowadzone były na mysich hodowlach pierwotnych glejowo-specyficznych komórek progenitorowych oraz neuronów zwojów korzeni grzbietowych.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska **wykazuje wiedzę teoretyczną** Kandydata w swojej dyscyplinie naukowej. Rozprawa została opatrzona bardzo dobrym i obszernym teoretycznym

wstępem, który wprowadza w podjętą tematykę badawczą. Pan mgr Piotr Rogujski prawidłowo sformułował hipotezę swoich badań. Na podstawie danych literaturowych, Doktorant założył, że nadekspresja neureguliny-1 lub jej egzogenne podanie zmienia właściwości funkcjonalne glejowo-specyficznych komórek progenitorowych i pozwolą na zwiększenie wydajności uzyskiwania mielinizujących oligodendrocytów w warunkach *in vitro*. Opracowanie takiej metody mogłoby zwiększyć potencjał regeneracyjnych badanych komórek.

Rozwiązanie problemu naukowego i metodyka badawcza

Autor rozprawy doktorskiej podjął dwa wątki badawcze, po pierwsze podejmując próbę transformacji glejowo-specyficznych komórek progenitorowych w celu uzyskania nadekspresji neureguliny-1, po drugie oceniając wpływ traktowania komórek egzogenną neuregulina-1. Próby transformacji komórek były wykonywane z zastosowaniem wektorów lentiwirusowych i lentiwirusowych cząsteczek aktywacyjnych kodujących neuregulinę-1 typu I. Trzeba zaznaczyć, że wektory lentiwirusowe są coraz powszechniej stosowane do transdukcji komórek dzielących się, w tym komórek nerwowych. Doktorant analizował jak endogenna lub egzogenna neuregulina-1 może modulować proliferację, migrację, a także różnicowanie glejowo-specyficznych komórek progenitorowych. W celu rozwiązania problemu naukowego Doktorant zastosował różne metody takie jak: pierwotne hodowle komórkowe, transdukcja komórek, analiza migracji komórek, immunocytochemia, cytometria przepływowa, PCR i Western Blot. Na podstawie przedstawionej rozprawy doktorskiej mogę stwierdzić, że Kandydat **posiada umiejętność samodzielnego planowania, prowadzenia i przedstawiania rezultatów swojej pracy naukowej.**

Uzyskane wyniki i ich znaczenie

Moim zdaniem przedstawiona **rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego.** Do najważniejszych osiągnięć Doktoranta wykazanych w pracy należy opracowanie metod hodowli pierwotnej glejowo-specyficznych komórek progenitorowych oraz neuronów zwojów korzeni grzbietowych, opracowanie metody transdukcji glejowo-specyficznych komórek progenitorowych wektorami lentiwirusowymi, opracowanie modelu badania migracji komórek z użyciem cyfrowej holograficznej mikroskopii bezsoczewkowej. Uzyskane wyniki dostarczają ważnych danych, jednakże nadal pozostawiają wiele pytań. W tym miejscu pozwolę sobie na zadanie najważniejszych pytań dotyczących uzyskanych rezultatów.

1. W pierwszej części wyników Doktorant ocenił fenotyp glejowo-specyficznych komórek progenitorowych, opisał je jako komórki o dwubiegunowej morfologii, zlokalizowane poza skupiskami komórek (Rycina 6). Natomiast immunocytochemicznie obecność markerów glejowo-specyficznych

komórek progenitorowych wykazano w skupiskach komórek (Rycina 7). Czy jest możliwe przedstawienie zdjęć z większych powiększeń, pozwalających na ocenę pojedynczych komórek? Interpretację zdjęć utrudnia także brak skali na Rycinie 6. Ponadto, Doktorant nie wykrył immunocytochemicznie obecności markerów NF200, MAP2, MBP2, wnioskując na tej podstawie o braku w hodowli neuronów i dojrzałych oligodendrocytów. W takim przypadku dobrym uzupełnieniem byłaby kontrola pozytywna dla zastosowanych przeciwciał.

2. W drugiej części Doktorant przeprowadził próbę transdukcji komórek wektorem pLenti-GIII-CMV-NRG-1 typ I-mCherry. Eksperyment wykazał, że transformowane komórki ulegają apoptozie w kolejnych pasażach. Czy w opisanych badaniach przeprowadzono transdukcję z wektorem kontrolnym (poza wektorem kodującym neureguliny-1 typ III)? Pozwoliłoby to na ocenę, czy sama procedura była toksyczna dla komórek, czy jest to efekt wykazanej nadekspresji neureguliny-1.

3. W trzeciej części wyników Doktorant stosował wektor HIV-SFFV-NRG-1 typ I-IRES-mRFP. W transformowanych komórkach obserwowano podwyższony poziom mRNA neureguliny-1. Nie wykazano natomiast obecności białka w komórkach, ani na ich powierzchni. W dyskusji Autor sugeruje, iż białko to ulega sekrecji, z tego powodu jego nadekspresja nie była wykrywana w komórkach. Czy przeprowadzono zatem analizę poziomu białka w pożywce znad komórek (ELISA lub Western blott)? Niestety bardzo interesujące zmiany ilościowe fenotypu komórek po transformacji wymienionym wirusem mają charakter badań wstępnych – stąd pytanie, czy w ogóle powinny zostać włączone do pracy doktorskiej?

4. W przypadku lentiwirusowych cząsteczek aktywacyjnych próba wywołania nadekspresji neureguliny-1 okazała się nieskuteczna. Analiza Western blot nie wykazała obecności neureguliny-1 ani w komórkach kontrolnych ani transdukowanych. Jednakże, tak jak w przypadku powyżej opisanych markerów i znakowania immunocytochemicznego, dobrym uzupełnieniem byłoby pokazanie kontroli pozytywnej dla zastosowanego przeciwciała.

5. Badania dotyczące suplementacji egzogenną neureguliny-1 są bardzo interesujące, niestety również częściowo mają charakter badań wstępnych (migracja komórek). Dobrym uzupełnieniem tej ważnej części byłaby analiza ilościowa zmian w wydajności różnicowania komórek w kierunku mielinizujących oligodendrocytów w obecności egzogennej neureguliny-1.

6. Z przedstawionych wyników wynika, że poziom ekspresji mRNA neureguliny-1 w kontrolnych glejowo-specyficznych komórkach progenitorowych jest bardzo niski, nie obserwowano także obecności białka (immunocytochemia, Western blot). Stąd nasuwa się kilka bardziej ogólnych pytań. Po pierwsze, jaki jest poziom i rola syntetyzowanej neureguliny-1 w kontrolnych glejowo-specyficznych komórkach progenitorowych? Po drugie, czy komórki te posiadają receptory dla tego białka (ErbB2, ErbB3, ErbB4)?

7. Doktorant umiejętnie sformułowała wnioski ze swojej pracy. Jednakże stwierdzenie, że wpływ neureguliny-1 zależy od układu doświadczalnego, jest moim zdaniem zbyt ogólne. Wymieniona obserwacja dotyczy przede wszystkim hodowli w warunkach nieróżnicujących i różnicujących. Zatem wydaje się, że wpływ neureguliny-1 zależy od etapu różnicowania komórek i dodatkowych sygnałów obecnych w środowisku. Czy zatem różna odpowiedź na traktowanie neuregulina-1 w warunkach nieróżnicujących i różnicujących, może być związana ze zmianami w ekspresji receptorów dla tego białka?

Forma pracy

Praca jest opatrzona dobrym streszczeniem w języku angielskim i polskim, a także wykazem skrótów. Tytuł pracy odzwierciedla jej treść. Forma pracy ma układ typowy dla tego rodzaju opracowań. Wszystkie pozostałe części rozprawy to jest: wprowadzenie, założenia i cel pracy, materiał badawczy, metodyka, wyniki badań, dyskusja, podsumowanie i wnioski zostały dobrze przygotowane oraz są kompletne. Piśmiennictwo zostało prawidłowo dobrane i jest niezwykle obszerne. Uwagi co do formy pracy to między innymi:

1. Zastosowanie terminu „ontogeneza glejowo-specyficznych komórek progenitorowych” wydaje się nie do końca ściśle. Ontogeneza to rozwój osobniczy organizmu, zatem w przypadku komórek należałoby raczej pisać o ich pochodzeniu.
2. Rozdział „Charakterystyka glejowo-specyficznych komórek progenitorowych” zawiera niespójne informacje dotyczące pochodzenia komórek. Na początku Doktorant wspomina, że glejowo-specyficzne komórki progenitorowe, podobnie jak zróżnicowane astrocyty i komórki gleju radialnego wywodzą się z neuronalnych komórek macierzystych. Następnie w podrozdziale 1.3.5.1. dowiadujemy się, że to neuralne komórki macierzyste powstają z gleju radialnego. Natomiast na Rycinie 2 pokazano, że to glejowo-specyficzne komórki progenitorowe są źródłem astrocytów. Neurogeneza jest bardzo złożonym procesem, stąd może poruszając te kwestie należałoby je poprzedzić wstępem i/lub schematem.
3. Na marginesie warto także wspomnieć, że minimalne kryteria dla komórek MSC – mesenchymal stromal cells opisane w pracy Dominici w 2006 roku, dotyczą komórek zrębowych. Autorzy pracy nie odnoszą się do ich macierzystego charakteru.
4. Tytuły podrozdziałów „Zastosowanie glejowo-specyficznych komórek progenitorowych w leczeniu ...” mogą być mylące, ze względu na to, że Doktorant opisuje eksperymenty na modelach zwierzęcych. Zatem dane te nie dotyczą zastosowania opisywanych komórek w praktyce klinicznej. Podobnie w dyskusji pojawia się stwierdzenie o „przydatności glejowo-specyficznych komórek

progenitorowych w leczeniu chorób demielinizacyjnych”, może warto byłoby wspomnieć o „potencjalnej przydatności”.

5. Wyjaśnienia niektórych skrótów znajdują się w tekście później, niż same skróty po raz pierwszy.

6. Strona 67 – w przypadku komórek powinniśmy pisać o ich liczbie (rzeczowniki policzalne), a nie ilości.

Niemniej jednak pomimo wymienionych uwag, przygotowanie formalne pracy oceniam jako bardzo dobre.

Wniosek końcowy

Podsumowując mogę stwierdzić, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną Kandydata w swojej dyscyplinie naukowej, a także umiejętność samodzielnego prowadzenia przez niego pracy badawczej. W mojej opinii przedstawiona do recenzji praca spełnia wszystkie warunki stawiane rozprawom doktorskim określone w artyku 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym. Wnoszę więc do Rady Naukowej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego PAN o dopuszczenie pana mgr Piotra Rogujskiego do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, dyscyplinie: nauki medyczne.

dr hab. Edyta Brzoska-Wójtowicz, prof. ucz.