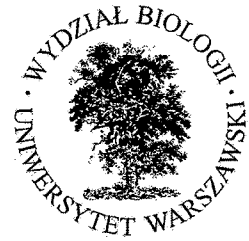




UNIwersytet  
Warszawski

Wydział Biologii  
Instytut Biologii Funkcjonalnej i Ekologii  
Zakład Immunologii  
prof. dr hab. Grażyna Korczak-Kowalska



Warszawa, 25.08.2023r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Piotra Aleksandra Rogujskiego,  
zatytułowanej:**

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

Praca doktorska mgr Piotra Rogujskiego została wykonana w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego PAN. Promotorem pracy jest prof. dr hab. Barbara Łukomska, a promotorem pomocniczym dr inż. Luiza Róża Stanaszek.

Tematyka ocenianej pracy dotyczy eksperymentalnych terapii chorób demielinizacyjnych, a ściślej poszukiwań nowych możliwości zwiększenia potencjału regeneracyjnego komórek wykorzystywanych w tych terapiach. Dotychczasowe badania nie przyniosły wystarczająco zadawalających efektów terapeutycznych, stąd poszukiwania nowych metod zwiększania właściwości regeneracyjnych podawanych *in vivo* komórek, w tym glejowo-specyficznych komórek progenitorowych.

W ten nurt poszukiwania nowych możliwości zwiększenia potencjału regeneracyjnego glejowo-specyficznych komórek progenitorowych wpisują się badania prowadzone przez mgr Piotra Rogujskiego. Podjął się zadania oceny czy nadekspresja neureguliny-1 w mysich glejowo-specyficznych komórkach progenitorowych (mGRP) zmienia ich właściwości, ważne w eksperymentalnych terapiach chorób związanych z demielinizacją oraz możliwość stymulacji tych komórek egzogennym rekombinowanym peptydem neuregulina-1 (NRG-1).

Należy uznać tę inicjatywę za ważne poznawczo zadanie naukowe z potencjałem aplikacyjnym.

Rozprawa doktorska Pana Piotra Rogujskiego przedstawiona została w postaci manuskryptu, zawierającego 135 stron i podzielonego na typowe dla tego rodzaju dysertacji rozdziały.

Wstęp jest bardzo dobrym wprowadzeniem do tematyki rozwijanej w rozprawie, opartym na przeglądzie wielu, ponad 340, pozycji z literatury przedmiotu i może stanowić podstawę do przygotowania publikacji przeglądowej, przedstawiającej najnowszą wiedzę dotyczącą glejowo-specyficznych komórek progenitorowych i ich zastosowania w terapii chorób neurodegeneracyjnych. Stanowi bardzo dobre wprowadzenie do postawienia celów badawczych, a wybór publikacji świadczy o swobodnym poruszaniu się Doktoranta w tematyce.

W oparciu o aktualną wiedzę, Doktorant określił cel badawczy, którym była weryfikacja hipotezy, zakładającej, że nadekspresja NRG-1 w mysich glejowo-specyficznych komórkach progenitorowych zmienia ich właściwości funkcjonalne, istotne w terapii chorób demielinizacyjnych. Przedstawił też etapy pracy doktorskiej, w ramach których były realizowane poszczególne zadania.

Mgr Piotr Rogujski zastosował w swojej pracy szereg metod z zakresu biologii molekularnej i biologii komórki, które dokładnie opisano. Przedstawiono również założenia i schematy przeprowadzonych analiz, co czyni pracę przejrzystą i dopracowaną metodologicznie. Na uwagę zasługuje dobra dokumentacja wyników, dokładny wyczerpujący opis rycin. Prawidłowo zostały dobrane testy laboratoryjne i odpowiednie kontrole. Analiza i ocena wyników badań świadczy o dobrym opanowaniu przez doktoranta metodyki badawczej stosowanej w doświadczeniach i wskazują na Jego dużą wiedzę i umiejętności w tym zakresie.

Doktorant wykonał szereg doświadczeń, w których opracował metodę izolacji i selektywnej hodowli mysich glejowo-specyficznych komórek progenitorowych. W kolejnych etapach badań wykonał transdukcję wspomnianych komórek wektorami lentiwirusowymi w celu wywołania nadekspresji neureguliny-1. Postawione cele badawcze zrealizowano w kilku etapach.

Ważnym, dającym możliwość przeprowadzenia dalszych zaplanowanych badań, osiągnięciem Doktoranta było opracowanie metody izolacji i selektywnej hodowli mysich glejowo-specyficznych komórek progenitorowych. Kolejne etapy dotyczyły analizy poziomu

ekspresji NRG-1 w zmodyfikowanych mysich glejowo-specyficznym komórках progenitorowych, fenotypu i właściwości funkcjonalnych tych komórek. W tym celu przeprowadził transdukcję mysich glejowo-specyficznym komórek progenitorowych dwoma wektorami lentiwirusowymi, pLenti-GIII-CMV-NRG-1 typ I-mCherry i HIV-SFFV-NRG-1 typ I-IRES-mRFP. W pierwszym przypadku, komórki w kolejnych próbach transdukcji prezentowały zróżnicowany poziom syntezy transkryptu dla NRG-1. Dalsza hodowla tych komórek skutkowała ich odklejaniem się i śmiercią. W drugim przypadku, transdukowane komórki wykazywały zróżnicowany poziom ekspresji mRNA dla NRG-1 typ I pomiędzy poszczególnymi próbami transdukcji. Przeprowadzona analiza fenotypowa wykazała w populacji transdukowanych komórek mniej progenitorów glejowych, więcej prekursorów oligodendrocytów, niedojrzałych oligodendrocytów oraz innych pośrednich form. Analiza poziomu mielinizacji aksonów nie wykazała istotnych różnic.

Podjęto również próbę wywołania nadekspresji endogennej NRG-1 przez transdukcję komórek lentiwirusowymi cząstkami aktywującymi, jednak bez istotnego efektu.

Ważną częścią rozprawy są wyniki badań opartych na stymulacji komórek egzogennym rekombinowanym peptydem neuregulina-1. Stwierdzono zróżnicowany wpływ. W warunkach hamujących różnicowanie komórek zaobserwowano obecność progenitorów glejowych i brak dojrzałych oligodendrocytów, jak również wzrost liczby komórek proliferujących. W warunkach stymulujących różnicowanie, obecna w podłożu neuregulina-1 obniżała poziom różnicowania komórek w kierunku mielinizujących oligodendrocytów. Zaobserwowano również niższą średnią prędkość migracji komórek hodowanych w obecności neureguliny-1. W pracy przedstawiono wyniki badań z użyciem neureguliny-1 w dwóch stężeniach. Dlaczego zastosowano właśnie te stężenia? Czy był to wybór spośród większego zakresu stężeń?

Uzyskane wyniki zostały omówione na tle dostępnej wiedzy. Dyskusja napisana jest dojrzałe i przejrzyste. Doktorant odnosi się do obszernego piśmiennictwa, konfrontuje własne wyniki z obserwacjami innych badaczy. Po dyskusji zamieszczono podsumowanie podkreślające najważniejsze osiągnięcia i wnioski z prowadzonych badań.

Doktorant podkreśla, że wyniki badań wstępnych sugerują, że neuregulina-1 zmienia fenotyp mysich glejowo-specyficznym komórek progenitorowych zwiększając ich proliferację, ale pogarsza zdolności migracyjne. Na wynik obserwacji duży wpływ mogą mieć warunki hodowli, dlatego potrzebne są dalsze badania. W jakim kierunku, zdaniem Doktoranta, powinny być prowadzone? Czy wykorzystanie glejowo-specyficznym komórek

progenitorowych w eksperymentalnych terapiach chorób neurodegeneracyjnych ma przyszłość i jaki typ modyfikacji komórek byłby optymalny?

Dysertacja napisana została starannie, mgr Piotr Rogujski w jasny sposób przekazuje założenia pracy, wyniki i ich znaczenie w badaniach światowych. Trudno też doszukać się większych uchybień edytorskich, poza nielicznymi literówkami czy niezręcznymi sformułowaniami.

Podsumowując, oceniam rozprawę doktorską mgr Piotra Rogujskiego bardzo pozytywnie. Doktorant wykazał się szeroką znajomością tematu, umiejętnością samodzielnego rozwiązywania postawionych zadań naukowych oraz znajomością i opanowaniem nowoczesnych technik laboratoryjnych.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.) w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018r. Przepisy wprowadzające ustawę- Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018r. poz. 1669 z późn. zm.).

Tym samym, przedstawiam Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk wniosek o dopuszczenie mgr Piotra Rogujskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



prof. dr hab. Grażyna Korczak-Kowalska