

Warszawa dn. 22.03.2022

Prof. dr hab. n. med. Marcin Mycko
Przewodniczący
Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Medyczne
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego
W Olsztynie

Szanowny Panie Profesorze.

Z prawdziwą przyjemnością zapoznałem się z treścią pracy doktorskiej Koleżanki Dominiki Gołubczyk pt. „Wykorzystanie technik wewnątrznaczyniowych w modelowaniu i leczeniu schorzeń neurologicznych”. Pozytywną opinię o recenzowanej rozprawie z wnioskiem do Rady Naukowej o dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego, pozwalam sobie przesłać na ręce Pana Profesora.

Pozostaję z szacunkiem


M. Roszkowski

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

lek. med. Dominki Gołubczyk pt. „Wykorzystanie technik wewnątrznaczyniowych w modelowaniu i leczeniu schorzeń neurologicznych”

Promotor: dr hab. n. med. Piotr Walczak, **Promotor Pomocniczy:** dr Izabela Małysz – Cymborska

Przedstawiona do recenzji rozprawa dotyczy istotnego problemu wykorzystania technik wewnątrznaczyniowych w badaniach przedklinicznych chorób OUN na dużych zwierzętach. Nowe strategie leczenia wymagają przeprowadzania planowanych procedur badawczych na zwierzętach, pozwala to na wgląd w procesy, których nie możemy obserwować in vitro. Przedkliniczne badania wykonywane są głównie na małych zwierzętach laboratoryjnych, co niestety nie do końca jest porównywalne z realnymi warunkami klinicznymi. Stąd wiele badań nad potencjalnie skutecznymi terapeutykami opracowywanych w oparciu o małe zwierzęta laboratoryjne nie przynosi oczekiwanych efektów, a międzynarodowe agencje ds. leków rekomendują wykorzystanie dużych modeli zwierzęcych do oceny skuteczności, trwałości odpowiedzi na dawkę oraz bezpieczeństwa zaawansowanych produktów leczniczych.

Współczesne badania leków pozyskiwanych metodami biotechnologicznymi, które cechują się dużymi rozmiarami, wymagają dostarczenia substancji terapeutycznych do miejsca docelowego w obrębie ośrodkowego układu nerwowego. Stwarza to konieczność podania ich drogą dotętniczną lub też bezpośrednio do tkanki, co pozwala na maksymalizację stężenia leku w tkance nerwowej i ograniczenie toksyczności ogólnoustrojowej. W praktyce laboratoryjnej dobrym modelem, zbliżonym do warunków klinicznych jest ośrodkowy układ nerwowy świni domowej. Problemem z podawaniem substancji terapeutycznych czy też wykonywania ogniskowych uszkodzeń drogą przez tętniczą u tego gatunku zwierząt laboratoryjnych jest różnica anatomiczna w budowie naczyń podstawy mózgu w stosunku do człowieka. Gatunkowe różnice anatomiczne uniemożliwiają prowadzenie badań w sposób kontrolowany i powtarzalny.

W świetle powyższych danych wybór tematyki badań wydaje się być jak najbardziej uzasadniony. Przedstawiona do recenzji praca doktorska jest oparta na zbiorze (dwóch) opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych. W skład rozprawy wchodzi prace pt.:

1. Gołubczyk, D., Kalkowski, L., Kwiatkowska, J. et al. Endovascular model of ischemic stroke in swine guided by real-time MRI. *Sci Rep* 10, 17318 (2020)

2. Malysz-Cymborska, I., Golubczyk, D., Kalkowski, L. et al. Intra-arterial transplantation of stem cells in large animals as a minimally-invasive strategy for the treatment of disseminated neurodegeneration. *Sci Rep* 11, 6581 (2021),

punktacja IF to 3,998 za każdą z prac i odnośnie 140 punktów MNiSW. Recenzowane czasopismo *Scientific Reports* jest pismem typu *Open Access* wydawanym przez Nature.

Opierając się na międzynarodowych zaleceniach dotyczących prowadzenia badań z wykorzystaniem dużych modeli zwierzęcych, a także możliwościach współczesnego obrazowania w neuroradiologii w tym wykorzystania metod dostępu wewnątrznaczyniowych, doktorantka postawiła niezwykle nowatorską hipotezę badawczą, która zakłada, że zastosowanie powyższych technik pozwoli na modelowanie i leczenie chorób ośrodkowego układu nerwowego u dużych zwierząt. Za główny cel pracy postawiła wykorzystanie technik radiologii interwencyjnej do opracowania mało inwazyjnej procedury indukcji udaru niedokrwienego u świni domowej oraz przeszczepu komórek macierzystych do OUN dużych zwierząt. Dla udowodnienia powyższych założeń doktorantka przyjęła szereg zadań badawczych. W eksperymencie 1 (opublikowana praca nr 1) podstawowym zadaniem było opracowanie metody pozwalającej na indukcję udaru niedokrwienego u świni domowej metodą embolizacji wewnątrznaczyniowej, a dalszym ocena możliwości wykorzystania MRI do monitorowania ognisk niedokrwienia w czasie rzeczywistym i odległej obserwacji. Natomiast eksperyment drugi (opublikowana praca nr 2) to ocena bezpieczeństwa i skuteczności przeszczepu komórek macierzystych drogą dotętniczą i w dalszym etapie ocena możliwości badań MRI biodystrybucji komórek macierzystych.

Podjęty temat jest oryginalny, a poddana badaniu grupa zwierząt doświadczalnych w pełni upoważnia autora do wyciągnięcia wniosków mogących wpłynąć na zmianę dotychczasowego paradygmatu, który kwestionuje możliwość wykorzystania dużych zwierząt do kontrolowanych i powtarzalnych badań na etapie przedklinicznym technikami wewnątrznaczyniowymi ze względu na budowę anatomiczną naczyń podstawy mózgu. Stąd dotychczas stosowane modele badawcze wykorzystywały jedynie dostęp operacyjny do naczyń mózgowych. Ten model postępowania uniemożliwiał jednak obserwację zjawiska reperfuzji.

O oryginalności i nowoczesności badań świadczyć może przyjęta przez doktorantkę metodyka prowadzonych eksperymentów. Na szczególną uwagę zasługuje eksperyment 1 ze względu na wykorzystanie techniki neuroradiologii interwencyjnej do podania materiału obturacyjnego (trombiny) oraz kontrastu (Gadolinu) i dostosowanie tempa i sposobu podawania tych środków tak, aby uzyskać kontrolowany obszar niedokrwienia. W założeniu w obszarze tętnicy środkowej mózgu, ale wcześniej pokonania przeszkody „nie do pokonania” jaką dotychczas w badaniach tego

typu stanowiła sieć bardzo drobnych naczyń podstawy tzw. *rete mirabile*. Jednocześnie prowadzone było monitorowanie zmian w mózgu przy użyciu MRI 3T, co pozwalało na ocenę w czasie rzeczywistym dokonujących się zmian niedokrwiennych. Drugi eksperyment potwierdza praktyczne zastosowanie opracowanej metodyki. Technika radiologii interwencyjnej zostaje w celach terapeutycznych podana zawieszona komórek macierzystych GRP i MSC, a ich dystrybucja w czasie rzeczywistym była obserwowana badaniem MRI. W obu eksperymentach kontrolę zasięgu i rozległości obszaru niedokrwienia czy dystrybucji podanych komórek macierzystych oraz zgodności z obrazami MRI wykonywano metodami badań histologicznych oraz molekularnych. Ta część pracy w załączonych publikacjach, ale także w podsumowaniu zbiorczym jest bardzo czytelnie ilustrowana schematami i rycinami ułatwiającymi rozumienie tak skomplikowanej metodyki zastosowanej w eksperymencie.

Zgodnie z obowiązującymi zasadami wszystkie procedury badawcze zostały zatwierdzone przez lokalną Komisję Bioetyczną UWM w Olsztynie, a wykonane zgodnie z wytycznymi ARRIVE.

Jako recenzent mam kilka uwag do tekstu, które nasuwają się na tym etapie oceny rozprawy doktorskiej Koleżanki Gołubczyk. W jakim stopniu to właśnie świni są przydatne jako model zwierzęcy chorób neurologicznych występujących u ludzi i co za tym idzie w jakim stopniu model udaru niedokrwiennego u świni odzwierciedlać może rzeczywistą sytuację kliniczną. Wydaje się, że informacje na ten temat powinny zostać przedstawione we wstępie do omawianego dzieła. Natomiast w opisie metody nie znalazłem chyba jednej z najważniejszych informacji w jaki sposób jest podawany kontrast, a później środki obturacyjne czy terapeutyczne poprzez mikrocewnik, tak aby uzyskać właściwą dystrybucję w obrębie naczyń mózgu. W pracy oryginalnej skwitowane jest to jednym zdaniem, że po prostu wykonywane jest to ręcznie pod kontrolą badań dynamicznych MRI w czasie rzeczywistym. Interesującym wydaje się zagadnienie czy tą „ręczną” metodą można zapewnić dokładność i powtarzalność.

Rozdział rozprawy poświęcony wynikom prowadzonych analiz jest najbardziej rozbudowaną częścią pracy, bogato ilustrowaną tabelami i rycinami. Z istotnych spostrzeżeń wynikających z analizy i potwierdzających w pełni postawioną hipotezę badawczą w zakresie eksperymentu 1 to fakt, iż wprowadzenie cewnika techniką wewnątrznacyniową w okolicę sieci drobnych naczyń podstawy u świni jest bezpieczne, a wstrzyknięcie środka kontrastowego pod kontrolą MRI w czasie rzeczywistym umożliwia dostosowanie prędkości infuzji w celu uzyskania zakontrastowania wybranego obszaru mózgu dostępnego poprzez mikrocewnik posadowiony poniżej sieci *rete mirabile*. Nowatorskie i w pełni oryginalne jest wykorzystanie dynamicznego obrazowania MRI w czasie rzeczywistym w trakcie wykonywania embolizacji z użyciem różnych sekwencji rezonansu w tym DWI, map ADC czy rekonstrukcji trójwymiarowej do oceny dynamiki

i zakresu zmian niedokrwiennych w trakcie aplikacji trombiny jako materiału obturacyjnego. Wyniki odległe MRI uzyskane po 24 godzinach i po miesiącu potwierdziły wywołanie ogniska niedokrwiennego z uszkodzeniem odległym bariery krew-mózg w zaplanowanym wcześniej obszarze półkuli mózgu. Wyniki te potwierdzone zostały ostatecznie w ocenie histologicznej tkanki z użyciem barwienia immunofluorescencyjnego.

Wyniki uzyskane w eksperymencie 2 w pełni potwierdzają skuteczność, własnej oryginalnej metody w doświadczalnym zastosowaniu komórek macierzystych podanych do zaplanowanego obszaru mózgu drogą przez tętnicą - neuroradiologii interwencyjnej. Podobnie jak w eksperymencie 1 wykorzystano metodykę celowanego podania i kontroli śródoperacyjnej z zastosowaniem dynamicznych metod MRI. W odróżnieniu od poprzedniego badania założeniem było bezpieczne podanie materiału terapeutycznego tak aby uniknąć przypadkowego zamknięcia naczyń i wywołania tym samym ognisk udarowych. Wyniki potwierdziły właściwą dystrybucję podanej zawiesiny komórkowej, dotyczyło to tylko komórek MSC oraz brak zmian niedokrwiennych. Dzięki opracowanej przez doktorantkę metodologii badacz przeprowadzający eksperyment, może w czasie rzeczywistym kontrolować podanie specyfików do wybranego obszaru mózgu z zachowaniem pełnego bezpieczeństwa w zakresie prawidłowego ukrwienia tkanki nerwowej.

W dyskusji autor omawia uzyskane wyniki i odnosi je do danych z literatury. Ten rozdział ocenianej rozprawy dowodzi, że autor nie tylko umie dyskutować, ale i ma do tego mocne podstawy w postaci bogatego, rzetelnie zebranego materiału, co widoczne jest w zebranych piśmiennictwie. Podkreślić należy znaczenie uzyskanych wyników dla praktyki badań eksperymentalnych w fazie przedklinicznej. Badacze dzięki opracowaniu przez doktorantkę nowej i nowatorskiej metody zyskują znakomite narzędzie w badaniach przedklinicznych. W podsumowaniu autorka podaje jakie są przewagi proponowanego modelu w stosunku do wcześniej stosowanych rozległych metod operacyjnych, nie znalazłem jednak odniesienia do możliwych problemów, które mogłyby być związane z proponowaną techniką, czy też trudności pojawiających się w trakcie badania i czy obserwowane były we własnym materiale. Interesujące, głównie w aspekcie przyszłych zastosowań metody jest zagadnienie związane z użyciem trombiny jako materiału embolizacyjnego. Opracowany model badawczy w założeniu służyć ma między innymi przedklinicznym badaniom specyfików stosowanych w leczeniu udaru mózgu, a w związku z tym czy podanie trombiny prowadzące do wykrzepiania w naczyniach krwionośnych pozwala na reperfuzję.

Praca jest napisana w sposób przejrzysty, zrozumiałym językiem. Przedstawione wyniki są przekonująco udokumentowane, a wnioski końcowe wynikają logicznie z całości materiału, odpowiadając na postawione we wstępie pracy cele. Na korzystną ocenę całości rozprawy wpływa bardzo staranne przedstawienie materiału, drobiazgowo, wieloaspektowa analiza danych i dobra dokumentacja ikonograficzna.

Pracę oceniam pozytywnie, ze względu na przedstawienie ważnego problemu badawczego i przedstawienia nowatorskiej, własnej metody pozwalającej nie tylko ułatwić, ale chyba nawet zrewolucjonizować przedkliniczne badania w zakresie ośrodkowego układu nerwowego dużych zwierząt. Autorka wykazała umiejętność właściwych metod opracowania materiału badawczego oraz posługiwania się piśmiennictwem.

Rozprawa doktorska przedstawiona do recenzji spełnia wszystkie ustawowe wymogi. Prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydatki w dziedzinie, której poświęcone są badania oraz wykazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Przedmiotem rozprawy doktorskiej jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wnosi nowe elementy poznawcze oraz praktyczne do dziedziny, której dotyczy. Rozprawę doktorską stanowi zbiór opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych opublikowanych w wysoko punktowanym, recenzowanym czasopiśmie *Scientific Reports* (<https://www.nature.com/srep>) należącym do portfolio jednego z najbardziej uznanych wydawnictw naukowych – *Nature*.

Reasumując stwierdzam, że praca lek. med. **Dominki Gołubczyk pt. „Wykorzystanie technik wewnątrznaczyniowych w modelowaniu i leczeniu schorzeń neurologicznych”** jest ambitnym zadaniem badawczym, które doprowadziło do samodzielnego rozwiązania istotnego problemu. Oceniana rozprawa doktorska jak wykazano powyżej spełnia warunki określone w Art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, Dz. U. 2018 poz. 1668 Z tego względu mam zaszczyt przedstawić wniosek do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o przyjęcie w/w pracy doktorskiej oraz dopuszczenie lek. med. Dominki Gołubczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

M. Roszkowski

