

Warszawa, 21.02.2022 r.

Prof. dr hab. n. wet. Romuald Zabielski, czł. koresp. PAN
Centrum Medycyny Translacyjnej
SGGW w Warszawie

Ocena rozprawy doktorskiej¹ mgr Dominiki Gołubczyk
pt. „Wykorzystanie technik wewnątrznaczyniowych w modelowaniu i leczeniu schorzeń
neurologicznych”

Ocena formalna

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Dominiki Gołubczyk obejmuje 45-stronicowe zwarte opracowanie w języku polskim, do którego dołączono 2 powiązane tematycznie oryginalne artykuły naukowe opublikowane w języku angielskim w *Scientific Reports* w 2020 i 2021 r., na których praca doktorska się opiera. Spójność tematyczna artykułów została logicznie wywiedziona we Wstępie dysertacji doktorskiej i nie rodzi uwag krytycznych. Przy każdej z publikacji zamieszczono oświadczenia współautorów prac określające merytoryczny wkład autora i doktorantki w powstanie publikacji użytych do pracy doktorskiej. Z zamieszczonych oświadczeń oraz rozdziału „Author contributions” każdej z prac wynika, że wkład pracy mgr Dominiki Gołubczyk w powstanie publikacji był znaczący. *Nota bene*, łączny dorobek naukowy mgr Dominiki Gołubczyk wg. Bazy Web of Science obejmuje 16 pozycji (pierwsza publikacja w 2017 r.), cytowanych w sumie 113 razy. Indeks *h* wynosi 6 (dane na dzień 18.02.2022).

Dysertacja zawiera 2 jednobrzmiące streszczenia w języku polskim i angielskim, spis publikacji, wykaz skrótów, wstęp, w którym jasno wyartykułowano hipotezę badawczą, cel pracy, oraz zadania badawcze do wykonania, następnie - materiał i metody rozdzielone na dwa eksperymenty, w podobnym układzie podano wyniki obu eksperymentów wraz z dyskusją, wspólne podsumowanie i wnioski oraz bibliografię (23 pozycje) i załączniki – oba wspomniane artykuły opublikowane w *Scientific Reports*. Dysertacja jest ilustrowana 10 złożonymi rycinami, po części zapożyczonymi z obu artykułów. Dysertacja została bardzo starannie przygotowana od strony językowej i edytorskiej. Mimo to, znalazłem w tekście kilka usterek, chociażby brak tytułu zawodowego Doktorantki na stronie tytułowej, niestosowanie się do reguły pisania terminów łacińskich kursywą (np. na str. 5, 6, 11), brak spacji przed nawiasem kwadratowym (np. na str. 12, 35, 37), zapisu symbolu związku chemicznego (CO₂) bez użycia indeksu dolnego (str. 20). Także ryciny opisane zostały w tekście na wzór angielskojęzycznych publikacji (Ryc.). W języku polskim pisze się „ryc.”

¹ Ocena rozprawy doktorskiej przygotowano zgodnie z art.187. Ustawy o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.2021.0.478 - Ustawa z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce).

małą literą. Trochę dziwi stosowanie w polskim tekście skrótów z języka angielskiego. Co prawda w przypadku OUN, PET, TK i RM mniej lub wcale, bo już się do tego przyzwyczailiśmy, ale np. w przypadku skrótów anatomicznych nazw naczyń krwionośnych (APA, ICA, MCA) to już tak. Opisy czynności operacyjnych i laboratoryjnych są jasne, klarowne i pozbawione terminów z żargonu laboratoryjnego, co wywołuje generalnie bardzo dobre wrażenie o pracy. Obie publikacje zamieszczono w postaci dobrej jakości reprintów na końcu dysertacji. Jako że materia badań jest cenna od strony metodycznej oraz bogata w odkrycia, wyniki opublikowano w czasopiśmie naukowym o wysokiej międzynarodowej renomie: 2-year impact factor: 4.380; 5-year impact factor: 5.134; Immediacy index: 0.783 (wyniki naliczenia za 2020 r., <https://www.nature.com/srep/about>).

Ocena merytoryczna

Autorka dysertacji podjęła się ambitnego celu poszukiwania nowych rozwiązań terapeutycznych w leczeniu udaru niedokrwiennego u ludzi. Celowość zajęcia się tą problematyką została w pracy rzeczowo udokumentowana z wykorzystaniem ogólnoswiatowych statystyk. Ze zrozumiałych względów praca Autorki nie jest w stanie zaproponować gotowego rozwiązania z uwagi na olbrzymią złożoność, ale stanowi dobry krok w kierunku lepszego zrozumienia procesu powstawania udaru niedokrwiennego, pozwala prześledzić dynamikę jego powstawania oraz sprawdzić teoretycznie możliwe rozwiązania terapeutyczne, o czym poniżej. Autorka słusznie zauważyła, że kontynuowanie badań na modelu małych zwierząt laboratoryjnych ogranicza poznanie procesu na pewnym poziomie. O technikach *in vitro* nie ma tu nawet co wspominać. Do przekroczenia tego poziomu niezbędne jest przeniesienie badań na inny, bliższy człowiekowi obiekt. Na człowieka? Jeszcze o wiele za wcześnie. Na inne naczelnę? Zbyt kosztowne i nieakceptowalne społecznie, podobnie z badaniami na psach. Autorka słusznie w moim przekonaniu zwróciła swoją uwagę na świnię domową, której rozmiary narządów oraz anatomia i topografia układu naczyniowego wykazuje wiele podobieństw do człowieka i wdrożyła model świński udaru niedokrwiennego w swoich badaniach z sukcesem. Czego mi zabrakło w krytyce modelu małych zwierząt laboratoryjnych (mysz, szczur), to argumentacji związanej z odmiennością metabolizmu, jego neurohormonalnej regulacji oraz mechanizmów powstawania zaburzeń metabolicznych w porównaniu do człowieka. Autorka sprawnie włączyła do swoich badań zdobycze diagnostyki obrazowej oraz technik endowaskularnych do bezpośredniej infuzji terapeutyków do naczyń mózgowych, co umożliwiło niebudzące wątpliwości docieranie do precyzyjnie określonych obszarów ukrwienia mózgu (coś czego nie sposób dobrze zrobić u małych zwierząt laboratoryjnych). Dzięki temu wypracowany model zyskał wysoką skuteczność i powtarzalność. To w moim przekonaniu największe osiągnięcie ocenianej pracy doktorskiej i tym samym znakomite wypełnienie pierwszego celu pracy. Świat nauki otrzymał wysoce powtarzalny model zwierzęcy umożliwiający przeprowadzenie udaru niedokrwiennego w ściśle kontrolowanych warunkach, umożliwiający nie tylko śledzenie rozwoju uszkodzenia, ale także śledzenie różnorodnych działań leczniczych i to na modelu bardzo bliskim człowiekowi. Uzyskana wiedza przy użyciu modelu zaproponowanego przez Autorkę pozwoli zmniejszyć ryzyko wykonania kolejnego kroku w kierunku badań klinicznych. W podsumowaniu Wstępu, Autorka zwięźle

wprowadza czytelnika w zagadnienie, umiejętnie dobiera argumenty i dobrze precyzuje cele pracy, a na koniec wyodrębnia 4 zadania badawcze do wykonania.

W części „Materiał i metody” Doktorantka sprawnie opisuje wszystkie procedury badawcze, zapewniając w moim przekonaniu powtórzenie badań w odpowiednio sprofilowanym laboratorium oraz w miejscu wykonywania badań na dużych zwierzętach (świniach) z odpowiednim zapleczem do prowadzenia diagnostyki obrazowej i operacji chirurgicznych. Liczba zwierząt użyta do badań jest moim zdaniem rozsądnym kompromisem, pozwala na nabranie biegłości operacyjnej i uzyskanie wysokiej powtarzalności w tworzeniu modelu. Kaliber zwierząt (40 kg masy ciała) nie budzi zastrzeżeń, no może nieco „miniaturyzuje procedury”, ale za to znacznie ułatwia obsługę zwierząt. Procedury uzyskały aprobatę Lokalnej Komisji Etycznej w Olsztynie. Z usterek, dostrzegłem opisy niektórych rycin po angielsku, drobne braki w referencjach użytych leków (ketamina - brak producenta) i skanera histologicznego (str. 17). Opis metod statystycznych także nie budzi zastrzeżeń. Odnośnie do Eksperymentu II, mam te same uwagi co do eksperymentu I, chociaż w tym przypadku liczba zwierząt, psów i świń, jest w mojej ocenie skromna.

W części „Wyniki” zamieszczone zostały *de facto* i wyniki, i po części dyskusja, stąd należałoby rozważyć bardziej informatywny tytuł rozdziału, jak np. „Wyniki i ich omówienie”. Na str. 24 Doktorantka nadmiernie spersonifikowała utratę życia przez zwierzęta, zmarł/umarł człowiek, zwierzę nie. W części I (Eksperyment I) zabrakło mi dokładniejszego opisu zestawu klinicznych badań neurologicznych stosowanych do oceny zwierząt po wywołaniu udaru i kinetyki procesu chorobowego. W tej mierze opisy badań obrazowych oraz anatomopatologicznych mózgu są o wiele szersze i dobrze dokumentują rozległość i przebieg zmian wywołanych wprowadzeniem cewnika, podaniem kontrastu, a następnie wywołaniem udaru za pomocą iniekcji trombiny. Miernikiem sukcesu były różnice w tempie wypłukiwania kontrastu w naczyniach mózgowych przed i po podaniu roztworu trombiny. Tempo tworzenia udaru niedokrwienego określano w badaniu w rezonansie magnetycznym przy użyciu map ADC, największe zmiany (wielkość dotkniętej udarem tkanki) odnotowano pomiędzy 49 a 79 minutą. Długotrwała ocena uszkodzenia była wykonywana z użyciem rezonansu magnetycznego. W 24 godzinie po indukcji udaru mimo szeregu zmian niedokrwienych nie zaobserwowano przerwania bariery krew-mózg, aczkolwiek miesiąc po indukcji takie przerwanie bariery obserwowano. Podobnych wyników (dowody na przerwanie ciągłości BBB) dostarczyła analiza skrawków histologicznych pobranych *post mortem*, w przypadku świń, które padły po zabiegu, ale także u świń, które uśpiono w 3 miesiące po wywołaniu udaru.

Celem Eksperymentu II było dotętnicze podanie pobranych uprzednio komórek do mózgu psów i świń. Psom podawano psie progenitory glejowe, których technikę uzyskania z płodów psów podano w szczegółach w części metodycznej pracy, oraz mezenchymalne komórki macierzyste wyizolowane z tkanki tłuszczowej suk podczas zabiegu sterylizacji. Świniom podawano mezenchymalne komórki macierzyste izolowane ze szpiku kostnego (szczegółowy opis metodyczny na str. 19). Wynik podania progenitorów glejowych u psów był niezbyt satysfakcjonujący, gdyż mimo iż udało się precyzyjnie podać komórki do krążenia korowego,

to następowało bardzo szybkie ich wypłukiwanie, praktycznie natychmiast po zakończeniu ich podawania. Bardziej satysfakcjonujące wyniki uzyskano w przypadku dotętniczego podania mezenchymalnych komórek macierzystych u świń. Okazało się, że MSC mają zdolność do „osadzania” się na dłużej w mózgu. To badanie służyło jako wstępne dla opracowania dawki MSC podawanym psom z mielopatią degeneracyjną, u których podanie psich MSC zakończyło się wychwyceniem podanych komórek przez śródbłonek naczyń mózgu. Badanie bezpieczeństwa dotętniczego podania komórek w rezonansie magnetycznym wykazało, co prawda osadzenie podanych komórek w mózgu, ale bez zmian anatomopatologicznych (tj. zapalenie, krwotok, udar niedokrwienny) ani w miejscu ich podania ani w innych obszarach mózgu. Rezultaty badań w rezonansie magnetycznym zostały poparte oceną histologiczną, chociaż zauważono zmiany w ekspresji (3 na 9) pojedynczych genów w tkankach - zmniejszoną ekspresję mRNA Iba-1 i GFAP oraz zwiększoną ekspresję mRNA MCT2, pozostałe bez zmian. Zabrakło mi tu wyjaśnienia, że np. spadek ekspresji Iba-1 podlegającego specyficznej ekspresji w makrofagach i mikrogleju sugeruje brak odpowiedzi okolicznych tkanek na podanie dotętnicze MSC, a może też potwierdzać histologicznie brak ischemii (wsparcie wyniku z rezonansu magnetycznego). Z kolei GFAP wydaje się pełnić rolę w utrzymaniu kształtu, ruchu i funkcji astrocytów makrogleju, co może wskazywać na działanie niepożądane z pozycji odżywiania neuronów. Reasumując, nazbyt skromna dyskusja niezwykle interesujących i cennych poznawczo wyników - jest to część pracy, która budzi największy niedosyt poznawczy u recenzenta.

Rozdział „Podsumowanie” jest skoncentrowany na podsumowaniu wyników na tle skromnie przytaczanej literatury (zaledwie 23 pozycje, ale za to starannie dobrane). Poza jedną niezręcznością stylistyczną (str. 37 - ... leczenie MSC podawanych...) nie mam uwag krytycznych domyślając się intencji Autorki, że w rozdziale tym chce zająć się wyłącznie stroną metodyczną swoich badań. W tej mierze Doktorantka precyzyjnie porównała metody wywoływania udaru niedokrwiennego dotąd stosowane z uzyskanymi przez siebie wynikami oraz bardzo krótko podsumowała wyniki podania komórek macierzystych na integralność tkanki nerwowej. Pracę kończy 6 wniosków, które korespondują z celem pracy i nie budzą zastrzeżeń z wyjątkiem wniosku 4, który jest zbyt ogólny. Spis piśmiennictwa (Bibliografia) został przygotowany starannie i według jednolitego schematu.

Wniosek końcowy

Po dokładnym zapoznaniu się z pracą doktorską mgr Dominiki Gołubczyk uważam, że Autorka pracy posiadała wymaganą znajomość warsztatu metodycznego badań na zwierzętach i pracy laboratoryjnej (pobieranie i izolowanie komórek, badania mikroskopowe). Potrafiła zbudować model zwierzęcy, interesujący i ważny z punktu widzenia badań nad udarem ischemicznym, oraz sprawdzić w działaniu. Uważam, że jest to największa wartość tej pracy, która niewątpliwie zostanie szeroko wykorzystana. W istocie, artykuł wydany w październiku 2020 uzyskał do dzisiaj wg. bazy WoS 5 cytowań! Doktorantka poza umiejętnościami niezbędnymi w pracy eksperymentatorskiej, potrafi logicznie opisać i zinterpretować otrzymane wyniki. Uwagi krytyczne zawarte w recenzji nie umniejszają wartości naukowej dysertacji.

Mając powyższe na uwadze pragnę stwierdzić, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Dominiki Gołubczyk pt. „Wykorzystanie technik wewnątrznaczyniowych w modelowaniu i leczeniu schorzeń neurologicznych” w pełni odpowiada warunkom określonym w art.187. Ustawy o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.2021.0.478 - Ustawa z dnia 20 lipca 2018 r.). Wnoszę zatem do Rady Naukowej Dyscypliny nauki medyczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego wniosek o dopuszczenie mgr Dominiki Gołubczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

W mojej ocenie praca jest na tyle wartościowa od strony poznawczej i praktycznej, że wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny nauki medyczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o wyróżnienie pracy mgr Dominiki Gołubczyk. Przemawiają za tym fakty jak we wniosku końcowym.



Prof. Romuald Zabielski