



Wrocław 29 marca 2022 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Łukasza Kalkowskiego

Temat rozprawy: Indukowana autoimmunologiczna demielinizacja –przedkliniczny model stwardnienia rozsianego

Rozprawa doktorska mgr Łukasza Kalkowskiego przedstawia opracowanie przedklinicznego modelu stwardnienia rozsianego, o obszarze ograniczonym do istoty białej mózgowia, uzyskanego poprzez podprogową immunizację przeciwko antygenom mieliny, a następnie selektywnym przerwaniu ciągłości bariery krew-mózg przy użyciu VEGF.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Łukasza Kalkowskiego została wykonana pod kierunkiem dr hab. n med. Piotra Walczaka, prof. UWM, w Katedrze Neurochirurgii Wydziału Lekarskiego Collegium Medicum Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Promotorem pomocniczym niniejszej rozprawy jest Pani dr Joanna Kwiatkowska.

Tytuł rozprawy został jasno sformułowany i odzwierciedla treści zawarte w dysertacji. Jest to opracowanie powstałe na podstawie publikacji autorstwa L. Kalkowski, D. Golubczyk, J. Kwiatkowska, M. Domzalska, P. Walczak and I. Malysz-Cymborska (2022) pt. "Local autoimmune encephalomyelitis model in a rat brain with precise control over lesion placement." PLoS One 17(1): e0262677, której Doktorant jest pierwszym autorem.

Praca została napisana w języku polskim na 31 stronach maszynopisu, zawiera 5 rycin i jedną tabelę. Objętościowo skromna rozprawa posiada układ typowy dla prac doktorskich tj. Streszczenia w języku polskim i angielskim, wprowadzający w temat rozprawy Wstęp, jasno sformułowane Cel pracy oraz Hipotezy i Zadania badawcze, opisy stosowanych Materiałów i Metod, Wyniki, Dyskusję, Podsumowanie, Bibliografię. Pozostałą część pracy stanowią załączniki w postaci w.w. publikacji źródłowej oraz oświadczenia współautorów o wiodącej roli Doktoranta w powstawaniu pracy oryginalnej polegającej na: projektowaniu i wykonywaniu eksperymentów, kolekcji, analizie i interpretacji danych, pisaniu manuskryptu oraz ostatecznym zatwierdzeniu pracy.

Stwardnienie rozsiane (SM – sclerosis multiplex) jest chorobą ośrodkowego układu nerwowego należąca do grupy schorzeń zapalno-demielinizacyjnych o niewyjaśnianej do końca patogenecie. Kluczową rolę w rozwoju choroby SM odgrywa proces autoagresji układu odpornościowego, którego celem ataku jest mielina budująca osłonki włókien nerwowych



ułatwiających transmisję impulsów nerwowych. Rozwój choroby prowadzi do powstawania rozszanych ognisk demielinizacyjnych co skutkuje upośledzeniem przewodzenia sygnałów z ośrodkowego układu nerwowego.

Wstęp jest bardzo zwięzły i skupia się na dotychczasowym klasycznym modelu eksperymentalnego zapalenia mózgowia i rdzenia kręgowego (experimental autoimmune encephalomyelitis; EAE). Oczekiwałamby szerszej informacji dotyczącej klinicznej złożoności stwardnienia rozszanego w kontekście proponowanego modelu do badań eksperymentalnych. Ponadto, we Wstępie brakuje informacji w jaki sposób VEGF wpływa na przerwanie ciągłości bariery krew-mózg w odniesieniu do proponowanego modelu SM? Oczekiwałamby również informacji dotyczącej glikoproteiny oligodendrocytów - MOG (myelin oligodendrocyte glycoprotein), białka stanowiącego integralną komponentę osłonki mielinowej będącego celem ataku immunologicznego w centralnym układzie nerwowym w przebiegu SM, gdyż obecność przeciwciał przeciwko białku MOG jest wykładnikiem procesu autoagresji.

Cele pracy i hipotezy badawcze zostały przejrzysto sformułowane.

Rozdział Materiał i Metody zawiera informacje dotyczące zastosowanych metod i wraz z przedstawionymi wynikami nie pozostawia wątpliwości, że Doktorant opanował warsztat badawczy w zakresie niezbędnym do przeprowadzenia badań stanowiących cel niniejszej rozprawy doktorskiej.

Wyniki. Opracowany model SM polega na wywołaniu miejscowego autoimmunologicznego zapalenia w pożądanym rejonie mózgowia co wyróżnia ten model od dotychczas stosowanego modelu rozszanego autoimmunologicznego zapalenia mózgowia i rdzenia kręgowego obejmującego cały ośrodkowy układ nerwowy. Przedstawiony nowy model SM, który nazwano miejscowym autoimmunologicznym zapaleniem mózgowia i rdzenia (local autoimmune encephalomyelitis; LAE) został opracowany na modelu szczurzym, w którym zmiana patologiczna dotyczy istoty białej mózgu - obszaru najczęściej uszkodzanego w przebiegu SM. W tym celu wywołana została ogólnoustrojowa odpowiedź układu immunologicznego przeciwko antygenom osłonki mielinowej z użyciem homogenatu tkanki bydłowego rdzenia kręgowego i adiuwantu Freund. Sposób przeprowadzenia procedury nie indukował objawów neurologicznych. Miejscowe stereotaktyczne podanie VEGF w rejon istoty białej, celem czasowego otwarcia bariery krew-mózg, wywołało lokalną zmianę autoimmunologiczną o charakterze demielinizacyjnym. Efekt autoimmunologiczny został potwierdzony obecnością autoprzeciwciał przeciwko białku MOG, natomiast efekt demielinizacyjny z obecnością nacieków zapalnych w obszarze podania VEGF potwierdzono histopatologicznie i barwieniem immunofluorescencyjnym.

Jednym z zadań badawczych było „Opracowanie protokołu immunizacji obwodowej bez bezpośrednich następstw neurologicznych”, jednakże w pracy nie przedstawiono wyników protokołu immunizacji. Proszę o wyjaśnienie na jakiej podstawie opracowano dawkę



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ

IM. LUDWIKA HIRSZFELDA

POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA

Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.iitd.pan.wroc.pl

immunogenu niezbędną do wywołania podprogowej odpowiedzi autoimmunologicznej? Czy dokonano pomiaru białka w przygotowanym homogenacie rdzenia kręgowego i badano różne dawki immunogenu lub badano wpływ innych objętości homogenatu niż użyte w doświadczeniu objętości 250 μ l odpowiadającej 200 μ g tkanki rdzenia kręgowego? Nie ma na ten temat informacji ani w Materiałach i Metodach ani w rozdziale Wyniki.

W rozdziale Dyskusja, Doktorant dokonał analizy i interpretacji uzyskanych wyników na tle piśmiennictwa, liczącego 38 pozycji, w większości opublikowanego w ostatnich latach. Skromna liczba publikacji cytowanych w rozprawie doktorskiej prawdopodobnie podyktowana jest brakiem możliwości odniesienia opublikowanych dotychczas wyników badań do opracowanego nowego modelu stwardnienia rozsianego, jednakże uzyskane wyniki niniejszej dysertacji powinny być szerzej dyskutowane w odniesieniu do istniejących modeli SM i efektywności ich wykorzystania w badaniach nad leczeniem schorzeń o charakterze demielinizacyjnym. Ponadto, w Dyskusji brakuje omówienia tematu specyficzności stereotaktycznego podania VEGF i wywołania efektu demielinizacji. Oczekiwałabym również wskazania potencjalnych strategii terapeutycznych, w których opracowany model SM może znaleźć zastosowanie.

W podsumowaniu chciałabym podkreślić, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Łukasza Kalkowskiego stanowi oryginalne osiągnięcie naukowe, polegające na opracowaniu modelu miejscowego autoimmunologicznego zapalenia mózgowia i rdzenia, które niewątpliwie przyczyni się do rozwoju badań dotyczących leczenia chorób związanych z procesem demielinizacyjnym. Biorąc pod uwagę przedstawione przez Doktoranta wyniki, należy podkreślić, że postęp w kreowaniu nowych modeli doświadczalnych w obszarze badań nad schorzeniami ośrodkowego układu nerwowego oraz dostępność nowoczesnych metod obrazowania zmian patologicznych daje możliwość wielokierunkowego badania skuteczności potencjalnych terapii, w tym terapii komórkowych w stwardnieniu rozsianym.

Stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity: Dz.U. z 2021 r. poz. 478 ze zmianami), stawiane rozprawom na stopień doktora, wnoszę zatem do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie mgr Łukasza Kalkowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kierownik
Laboratorium Biologii Komórek
Macierzystych i Nowotworowych

Prof. dr hab. Aleksandra Klimczak