

ul. Strzeszyńska 32
60-479 Poznań

tel. +48/61/657 91 00
fax +48/61/823 32 35
e-mail: igcz@man.poznan.pl

www.igcz.poznan.pl

Recenzja

pracy doktorskiej (w formie rozprawy) autorstwa mgra Łukasza Kalkowskiego, pt. „ Indukowana autoimmunologiczna demielinizacja – przedkliniczny model stwardnienia rozсіяnego”

Aczkolwiek rozprawa jest ciekawa, obawiam się, że będziemy mieli problem z kwalifikacją tej pracy. Do rozprawy załączony jest bowiem anglojęzyczny tekst publikacji o nieco zmodyfikowanym tytule, aczkolwiek wiernie oddający treść rozprawy. Rozprawa, zaś sama w sobie, identyfikuje materiał eksperymentalny na tylko jedną publikację, przynajmniej tak się wydaje z oglądu wyników. Gdyby poddać to surowszej analizie, w większości uniwersytetów broniące są rozprawy (tzw. spinka) z co najmniej 3 publikacji impaktowanych, przy czym dwie z wyników oryginalnych. Tutaj zaś Wstęp jest na tyle „cieniutki”, że nie stanowi żadnej możliwości np. przekonwertowania go w pracę pogładową. Zatem trzeba będzie rozprawę skonfrontować z wymaganiami uczelni, które zwykle przedstawiane są w uniwersyteckim regulaminie promocji. Do tytułu powinno być moim zdaniem dodane słowo „Indukowana lokalna demielinizacja....”

Albowiem takie było zadanie postawione autorowi tej pracy – to jest wynalezienie takiego narzędzia eksperymentalnego, który gwarantowałby lokalną demielinizację wybranego rejonu mózgowia. Jak słusznie podkreśla autor, w swoim nader wątlým wstępie – dotychczasowe modele eksperymentalnego indukowanego zapalenia mózgu obejmują zmiany chorobowe w całym ośrodkowym układzie nerwowym, „na upartego” przypominające stwardnienie rozsiane (MS – *sclerosis multiplex*).

Zatem głównym punktem ciężkości tej pracy jest innowacyjna metoda indukowania lokalnej demielinizacji (którą potem pewnie będzie można lokalnie zaopatrzyć wybranymi substancjami biologicznymi) poprzez wprowadzenie podprogowej metody autoimmunizacji obwodowej (systemowej) mieliną, a następnie otwarcie czasowe bariery krew-mózg poprzez stereotaktyczną iniekcję VEGF (*ang. vascular endothelial growth factor*) w rejon istoty białej. W części dotyczącej metodologii wykonawstwa niepokój budzi pytanie dlaczego tylko samce poddano eksperymentowi, przeczy to ideologii równości płci, a zarazem obniża wartość pracy,



albowiem mimowolnie rodzi się pytanie czy płęć żeńska równocennie reagowałaby na proponowany reżim eksperymentalny. Tabela 1 jest również niejasna – ma niby wprowadzać do istoty proponowanego doświadczenia, ale więcej niepokoi niż wyjaśnia – np. czy zamiast VEGF (kolumna „Sama immunizacja”) – czy nie powinien być np. podawany porównawczo roztwór soli fizjologicznej? Co oznaczają dni 3 oraz 7 w kolumnie LAE, który to termin zresztą nie jest wyjaśniony ani pod tabelą, ani w skrótach poprzedzających pracę – czy są to 2 warianty czy tylko dwa różne punkty czasowe weryfikacji LAE? (*ang.* local autoimmune encephalomyelitis). Nie jest też podane w części metodycznej skąd autor rozprawy zaczerpnął stężenia antygeny i ew. VEGF – czy miareczkował je sam? (ale nie ma na ten temat ani jednego zdania) czy też ktoś mu w tym podpowiedział?...Jak chodzi o opis oceny behawioralnej to kontakt kończyn ze ścianą cylindra powinien być zobrazowany graficznie – inaczej nie wiadomo jak ta ocena przebiegała – podobno na podstawie liczby obu kontaktów ze ścianą cylindra (to znaczy jakich...?) odbywających się jednocześnie czy naprzemiennie? Jaka rolę spełnia peptyd HOG?? To dowiadujemy się w rozprawie dopiero po jakimś czasie, niemniej – jedno zdanie należałoby się już na stronie 13 („nomen omen”). Praca jest interesująca ale niesłychanie uboga metodologicznie. Raptem mamy immunizacje, podejście stereotaktyczne, ocenę behawioralną, oznaczenie przeciwciał (dlaczego na przykład nie oznaczono w płynie mózgowo-rdzeniowym cytokin – oraz we krwi obwodowej – nadałoby to pewną głębię tej pracy), histologię i analizę obrazów. Malutko...Chyba tylko oryginalność tematu broni tę pracę.

Wyniki: Nie wiem na jakiej podstawie doktorant kokluduje, że przedstawiona na Ryc 1, a,b odpowiedź humoralna jest tożsama z wystąpieniem reakcji na antygeny/epitopy mielinowe. Tylko na podstawie tego, że peptyd MOG coś wzbudził? Takie twierdzenie mogłyby wesprzeć absorpcje krzyżowe przeciwciał, jednak nie zostały one wykonane!. Nie wiemy też co też doktorant miał na myśli produkując nawias u góry strony 16 („reakcji specyficznej w trakcie EAE”) – skoro wcześniej uzgodniliśmy, że reakcja EAE jest raczej niespecyficzna i obejmuje rzutami cały OUN. W podpisie do Ryc. 2 przedstawiono wyniki oceny behawioralnej – podpisując „dotknięć dla grup leczonych pełną terapią” – a czy w tej rozprawie zastosowano jakąkolwiek terapię w stosunku do LAE? Ocena histologiczna przeprowadzona w dalszej części dysertacji dokumentuje zmiany w tkance mózgowej wywołane operacją typu „sham”, z zastosowaniem samej immunizacji oraz pełnej procedury (immunizacja + VEGF). Preparaty barwiono hematoksyliną + eozyną oraz błękitem eriochromowym. Osiągnięcie wywołania lokalnego efektu autoimmunizacji wybranej okolicy mózgowia (zmiany demielinizacyjne) wydaje się być dobrze udokumentowane w wynikach histologicznych, jakkolwiek w ocenie



czasowej (3 lub 7 dni po indukcji przez podanie VEGF) widać wyraźnie ucieczkę (w drugim punkcie czasowym) nacieku leukocytno-monocytnego. Nie dotyczy to rzecz jasna komórek śródbłonna. Niedorobiony obraz odczynu zapalnego domagałby się podwójnego barwienia CD31 z antygenami HLA klasy I oraz II. To wniosłoby istotny wkład w interpretację zakresu indukcji odpowiedzi immunologicznej, w aspekcie ramienia adaptatywnego. Ta szansa nie została wykorzystana.

Dyskusja jest zwięzła i rzeczowa, dokumentując znalezisko doktoranta w postaci zaindukowanego lokalnego zapalenia istoty białej mózgu, ograniczonego do wybranego ogniska topograficznego. Przygotowanie tego modelu może mieć istotne skutki dla dalszych badań nad funkcją ośrodkowego układu nerwowego i poszczególnych jego lokalizacji jak również podjęcia różnych acz zlokalizowanych strategii terapeutycznych.

Reasumując, ocena przedstawionej pracy promocyjnej jest pozytywna, pomimo zgłoszonych krytycznych uwag, które mają na celu bardziej wszechstronne naświetlenie obserwowanych zaindukowanych zmian. Pomimo ubogiej warstwy dokumentacyjnej całość pracy spełnia, moim zdaniem, wymogi dotyczące prac promocyjnych, przeto przedkładam swoją rekomendację i wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Medycznej Collegium Medicum Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego mgra ŁUKASZA KAŁKOWSKIEGO



Poznań, dnia 21.03. 2022

Maciej Kurpisz

