

Prof. dr. hab. med. Andrzej Szczudlik
Specjalista neurolog
Ul. Praska 28 m.13, 30-328 Kraków

Kraków, 20.12.2016

Opinia na temat dorobku naukowego i osiągnięcia naukowego
(monotematyczny cykl publikacji) pt. "Optymalizacja metody przeszczepiania komórek do
ośrodkowego układu nerwowego w modelach zwierzęcych z wykorzystaniem obrazowania
wielomodalnego"

dr med. Mirosława Janowskiego

Dr med. Mirosław Janowski urodził się w 1975 roku. W 2001 roku skończył studia medyczne na Wydziale Lekarskim Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (WUM) w Warszawie oraz studia psychologiczne na Wydziale Psychologii Uniwersytetu Warszawskiego. Staż podyplomowy odbył w latach 2002-2003 w Samodzielnym Publicznym Centralnym Szpitalu Klinicznym w Warszawie przy ul. Banacha. Bezpośrednio po stażu, od 2003 roku, podjął pracę na pełnym etacie w tym samym szpitalu, w Klinice Neurochirurgii. Jednocześnie zastał także zatrudniony na ½ etatu w Zakład Neurobiologii Naprawczej, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej (IMDiK) im. M. Mossakowskiego PAN w Warszawie. Stopień specjalisty z zakresu neurochirurgii zdobył w 2009 roku i wkrótce potem zmienił miejsce pracy na Klinikę Neurochirurgii i Zespół Badawczo-Lecznicy Neurochirurgii IMDiK, w którym pozostaje dotychczas, kontynuując również zatrudnienie w Zakładzie Neurobiologii Naprawczej tego Instytutu.

W 2010 roku obronił w IMDiK PAN doktorat zatytułowany „Neurotransplantacje eksperymentalne ludzkich neuralnych komórek macierzystych oraz analiza czynników warunkujących ich migrację”, którego promotorem była prof. Krystyna Domańska-Janik, a recenzentami prof. Tomasz Trojanowski i prof. Marcin Majka.

Wkrótce potem, w lutym 2011, wyjechał na staż podoktorski w Uniwersytecie Johna Hopkinsa w Baltimore (USA), a po jego ukończeniu uzyskał tam zatrudnienie, które kontynuuje dotychczas, początkowo jako instruktor, a od grudnia 2012 roku na stanowisku *assistant professor*. Od 2011 roku łączy więc pracę w Zakładzie Neurobiologii Naprawczej i Zespole Badawczo-Lecznicy Neurochirurgii IMDiK PAN w Warszawie z pracą w Zakładzie Radiologii i w Instytucie Inżynierii Komórkowej Uniwersytetu Johna Hopkinsa w Baltimore. Kwalifikacje zawodowe i naukowe zdobywane w w/w instytucjach krajowych i zagranicznych uzupełnił w latach 2000- 2008 dziewięcioma stażami w zagranicznych ośrodkach naukowych.

Pierwsza publikacja pracy naukowych dr med. Mirosława Janowskiego pochodzi z roku 2004 i jest listem do redakcji dotyczącym przydatności angiografii w dokumentowaniu tętniaków. Od 2006 roku datują się liczne publikacje prac eksperymentalnych, dotyczące głównie różnych aspektów transplantacji komórek macierzystych, powstałe w Zakładzie Neurobiologii Naprawczej, kierowanej przez prof. Krystynę Domańską-Janik, lub we współpracy z innymi ośrodkami zagranicznymi. Były wykonywane na mysich lub szczurzych modelach chorób układu nerwowego, takich jak udar niedokrwienny mózgu, stwardnienie boczne zanikowe czy choroba Parkinsona. Oprócz prac eksperymentalnych dr Janowski był w latach 2006-2009 także współautorem kilku prac klinicznych powstałych w Klinice Neurochirurgii WUM w zespole prof. Andrzeja Marchela, dotyczących wyników leczenia jamistości rdzenia za pomocą zastawki jamisto-otrzewnowej, porównania dwóch technik leczenia malformacji czaszkowo-szyjnej i wzrostu małych glejaków po radioterapii. Był również w tym czasie autorem i dominującym współautorem 2 publikacji przeglądowych dotyczących neurotransplantacji.

Po zdobyciu specjalizacji i uzyskaniu doktoratu, habilitant skupił się na pracy badawczej w zespole Zakładu Neurobiologii Naprawczej i w zespołach naukowych w ramach Uniwersytetu Johna Hopkinsa w Baltimore. W efekcie tego powstały liczne publikacje poświęcone wielu różnym aspektom transplantacji komórek macierzystych, stanowiące kontynuację i rozszerzenia tematyki doktoratu. Ich dokładniejsze omówienie w ramach tej opinii nie jest możliwe ze względu na bardzo różne wykorzystywane modele i wielowątkowość tematyki. Najogólniej można jednak stwierdzić, że większość publikacji prezentuje badania oryginalne mające duże znaczenie naukowe i dotyczące kluczowych tematów przeszczepiania komórek do ośrodkowego układu nerwowego.

Podsumowując liczbowo dorobek naukowy dr med. Mirosława Janowskiego należy podkreślić, że jest on wyjątkowo duży i znaczący. Poza 7 pracami składającymi się na dzieło habilitacyjne, obejmuje 39 innych prac, głównie oryginalnych i cytowanych w PubMed. Prawie wszystkie z nich były publikowane w angielskojęzycznych czasopismach międzynarodowych mających określony współczynnik oddziaływania (IF), niekiedy bardzo wysoki, np. *Stem Cell*, *Stem Cell Dev*, *Stem Cell Res & Ther*, *Stroke*, *Teranostics*, *Mol Neurobiol*. 10 prac było opublikowanych przed obroną pracy doktorskiej, a pozostałe po doktoracie. W 10 z nich habilitant jest pierwszym autorem, a w kolejnych 9 drugim autorem. Łączny IF tych publikacji: 114,949. Dr Janowski publikował więc swoje prace w najlepszych czasopismach naukowych z obszaru prowadzonych badań. Liczba cytowań wszystkich opublikowanych w latach 2004-2016 prac (bez autocytowań) – 376. W punktacji MNiSW/KBN publikacje dr med. Mirosława Janowskiego zostały ocenione na 1269 punktów. Na dorobek naukowy habilitanta składają się także rozdziały w 5 publikacjach podręcznikowych międzynarodowych i w 1 krajowym, 1 list do redakcji oraz 115 streszczeń prac prezentowanych na konferencjach międzynarodowych, opublikowanych często w międzynarodowych czasopismach

naukowych i 4 na konferencjach krajowych. Łączna ocena aktywności publikacyjnej w indeksie Hirscha została w *Web of Science* oceniana na 12.

Podkreślenia wymaga udział habilitanta w licznych grantach naukowych, realizowanych zarówno w Polsce, jak i w USA. Dr Janowski był głównym wykonawcą lub wykonawcą 8 grantów finansowanych przez KBN, MNiSW, Fundację Nauki Polskiej i NCBR, realizowanych w Polsce i jest obecnie realizatorem dwóch wielonarodowych i wielośrodkowych grantów w ramach STRATEGMED I dotyczących wykorzystania potencjału regeneracyjnego komórek macierzystych i zastosowania progenitorów glejowych w leczeniu stwardnienia bocznego zanikowego. Był także kierownikiem dwóch grantowych projektów naukowych w USA i jest aktualnie kierownikiem lub wykonawcą 8 kolejnych grantów finansowanych z różnych źródeł (NIH, Departament Obrony, Narodowe Towarzystwo Stwardnienia Rozsianego).

Za działalność naukową habilitant był wielokrotnie nagradzany: w 2010 roku nagrodą PAN im. Jędrzeja Śniadeckiego, sześciokrotnie nagrodą dyrektora IMDiK PAN w latach 2010-2013 oraz 5 międzynarodowymi grantami podróżnymi. Jego osiągnięcia naukowe znalazły również uznanie przez zaproszenie do wygłoszenia 16 wykładów od organizatorów międzynarodowych konferencji tematycznych. Jest członkiem komitetów redakcyjnych lub rad naukowych 8 czasopism międzynarodowych poświęconych głównie tematyce transplantacji. Jest też recenzentem w kilkunastu czasopismach naukowych i ekspertem oceniającym projekty badawcze NCBIr oraz Amerykańskiego Instytutu Nauk Biologicznych.

Przedstawiony do oceny cykl 7 publikacji jako osiągnięcie naukowe został zatytułowany: "Optymalizacja metody przeszczepiania komórek do ośrodkowego układu nerwowego w modelach zwierzęcych z wykorzystaniem obrazowania wielomodalnego" i składa się z następujących publikacji:

1. Gorelik M, **Janowski M**, Galpoththawela C, Rifkin R, Levy M, Lukomska B, Kerr DA, Bulte JW, Walczak P. Noninvasive monitoring of immunosuppressive drug efficacy to prevent rejection of intracerebral glial precursor allografts. *Cell Transplant*. 2012; 21(10): 2149-2157.
2. **Janowski M**, Engels C, Gorelik M, Lyczek A, Bernard S, Bulte JW, Walczak P. Survival of neural progenitors allografted into the CNS of immunocompetent recipients is highly dependent on transplantation site. *Cell Transplant*. 2014; 23(2): 253-262.
3. **Janowski M**, Jablonska A, Kozłowska H, Orukari I, Bernard S, Bulte JW, Lukomska B, Walczak P. Neonatal desensitization does not universally prevent xenograft rejection. *Nat Methods*. 2012; 9(9): 856-858.
4. **Janowski M**, Lyczek A, Engels C, Xu J, Lukomska B, Bulte JW, Walczak P. Cell size and velocity of injection are major determinants of the safety of intracarotid stem cell transplantation. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2013; 33(6): 921-927.

5. **Janowski M**, Walczak P, Pearl MS. Predicting and optimizing the territory of blood-brain barrier opening by superselective intra-arterial cerebral infusion under dynamic susceptibility contrast MRI guidance. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2016; 36(3):569-575.
6. Walczak P, Wojtkiewicz J, Nowakowski A, Habich A, Holak P, Xu J, Adamiak Z, Chehade M, Pearl MS, Gailloud P, Lukomska B, Maksymowicz W, Bulte JW, **Janowski M**. Real-time MRI for precise and predictable intra-arterial stem cell delivery to the central nervous system. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2016 Sep 12; pii: 0271678X16665853.
7. **Janowski M**, Bulte JW, Walczak P. Personalized nanomedicine advancements for stem cell tracking. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012 Oct;64(13):1488-507.

Wszystkie prace zostały opublikowane w czterech ostatnich latach (2012-2016), w czasopismach z wysokim IF, a ich łączny IF wynosi 59,199. Najwyżej impaktowana praca ukazała się w *Nature Methods* (IF: 23,565). W 6 pracach dr Janowski jest pierwszym lub równorzędnym (publikacja nr 1) autorem, w 1 pracy autorem ostatnim. Udział w tych publikacjach w samocenie autora wynosi od 40 do 80%.

Pierwsze trzy prace składające się na oceniane osiągnięcie naukowe dotyczą poszukiwania łatwiejszych i szybszych niż badanie pośmiertne metod oceny przeżycia przeszczepionych komórek dla celu optymalizacji metod ochrony przeszczepu przed odrzuceniem. W pierwszej pracy habilitant i jego współpracownicy posłużyli się techniką bioluminescencji. Do glejowych komórek progenitorowych myszy wprowadzili odpowiedzialny za bioluminescencję gen lucyferazy i sprawdzili czułość detekcji *in vitro* poszczególnych komórek i stabilność tej transdukcji w czasie 20 pasażów komórkowych. Po ocenie tych aspektów metodologicznych przystąpili do oceny przydatności bioluminescencji do śledzenia przeżycia przeszczepu glejowych komórek progenitorowych pochodzenia płodowego u myszy immunokompetentnych BALB/c poddanych immunosupresji w dwóch różnych schematach: przy użyciu cyklosporyny A oraz FK506 i rapamycyny. Porównano przeżycie tych samych komórek u myszy immunokompetentnych i z upośledzoną przez pozabawienie genu rekombinazy (*rag2*^{-/-}) odpowiedzią immunologiczną. Podczas 24-dniowego okresu obserwacji wykazano przeżycie przeszczepionych komórek u wszystkich myszy *rag2*^{-/-} oraz tylko u 30% myszy bez upośledzenia odporności nabytej. U myszy poddanych immunosupresji cyklosporyną A przeżycie przeszczepu wynosiło 44.6 %, a u poddanych dwuskładnikowej immunosupresji (FK506+rapamycyna) akceptacja przeszczepu wyniosła nawet 77.8 %. Badanie pośmiertne potwierdziło obecność przeszczepionych komórek u wszystkich zwierząt, u których była widoczna bioluminescencja i ich brak u tych zwierząt, które jej nie wykazywały. Dowodzi to przydatności bioluminescencji do detekcji przeszczepianych komórek. Dodatkową obserwacją jest stwierdzenie, że odrzucanie przeszczepu progenitorów glejowych następuje stosunkowo szybko, w czasie 2-5 dni, a dwuskładnikowa immunosupresja lepiej chroni przeszczepiane komórki niż immunosupresja cyklosporyną A. W badaniu histologicznym stwierdzono również obecność nacieków komórek zapalnych w miejscu

podania progenitorów glejowych u wszystkich immunokompetentnych zwierząt poddanych immunosupresji, czego nie było u zwierząt *rag2*^{-/-}. Wysłano hipotezę, że przyczyną różnicy w odrzuceniu przeszczepu u zwierząt poddanych immunosupresji może być miejsce podania przeszczepu. Miejscem przeszczepu u badanych zwierząt było spoidło wielkie, ale umiejscowienie igły transplantacyjnej mogło być różne w odniesieniu do otoczenia włókien istoty białej. Hipoteza ta była podstawą przeprowadzenia kolejnej serii badań, których wyniki przedstawiono w publikacji nr 2.

Badania wykonano na takim samym modelu zwierzęcym z użyciem myszy immunokompetentnych i pozbawionych odporności nabytej (*rag2*^{-/-}), jak w badaniu poprzednim, z przeszczepem glejowych komórek progenitorowych pochodzenia płodowego u myszy w dwa różne, wyselekcjonowane miejsca różniące się mikrośrodowiskiem. W jednym przypadku były to szczypcy mniejsze (istota biała), w drugim – prążkowie (istota szara z udziałem pasm istoty białej). Zwierzęta nie poddawano immunosupresji. W porównaniu do badania pierwszego zastosowano także inny sposób oceny przeżycia przeszczepu – badanie MRI ukierunkowane na identyfikację komórek wyznakowanych nanocząsteczkami tlenku żelaza. Poprawność tej identyfikacji potwierdzano potem w badaniach histologicznych. Zaobserwowano odmienne ułożenie przeszczepu: w istocie białej miał on kształt walca w śladzie igły, a w prążkowie rozprzestrzenił się w kształcie półksiężyca między prążkowie a ciałem modzelowatym. Zasadnicza różnica widoczna była także w przeżyciu przeszczepu w zależności od jego lokalizacji. Wszystkie przeszczepy do szczypców mniejszych uległy odrzuceniu, a do prążkowie – przeżyciu. Poszukując przyczyny tej różnicy zbadano status bariery krew-mózg za pomocą oceny jej szczelności przez promieniowanie w dalekiej podczerwieni emitowane przez specjalne urządzenie (Pearl Imager, LICOR). W obu lokalizacjach bariera była podobnie rozszczelniona. Z tego powodu przeprowadzono kolejne eksperyment pozwalający na histologiczną metodę oceny przeżycia komórek przeszczepu we wczesnym okresie po przeszczepie, gdy jeszcze żyły komórki przeszczepione w obu lokalizacjach, co udokumentowano także metodą bioluminescencji. W ocenie histologicznej naciek komórek zapalnych obserwowano w obu lokalizacjach. Liczba komórek zapalnych, w tym komórek CD11b- i CD8- pozytywnych, była dużo większa w przypadku przeszczepów do istoty białej, czego nie stwierdzono w odniesieniu do komórek CD4-pozytywnych, które występowały bardzo rzadko. Dodatkowo zaobserwowano, że przeszczep zlokalizowany w istocie białej był otoczony mankietem aktywowanych komórek mikrogleju, co mogło negatywnie wpływać na przeżycie komórek dawcy. Podobnego nagromadzenia komórek mikrogleju nie zaobserwowano w prążkowie. Szczególny kształt i charakter ułożenia przeszczepionych komórek między prążkowie a ciałem modzelowatym skłonił badaczy do nazwania tego miejsca „kieszenia”. Różnicę w odpowiedzi zapalnej w różnych lokalizacjach przeszczepu habilitant i jego współpracownicy tłumaczą dodatkowym urazem mechanicznym mózgu, który mógł się ujawnić w przypadku istoty białej, z natury bardziej zbitiej niż w lokalizacji „kieszeniowej”. Według tego

wyjaśnienia komórki umiejscowione w kieszeni nie były atakowane przez układ immunologiczny biorcy, ale ich „ukrycie” może utrudniać ich funkcjonowanie. Druga publikacja pozwoliła na przynajmniej częściowe wyjaśnienie obserwacji opisanych w publikacji pierwszej, a sama z kolei była podstawą kolejnych badań.

Badania przedstawione w publikacji trzeciej wiążą się z opublikowanym w 2009 roku sensacyjnym doniesieniem zespołu z Uniwersytetu w Cardiff o możliwości uzyskania tolerancji biorcy nawet na ksenoprzeszczep poprzez zastosowanie desensytyzacji u osesków myszy. Sama idea desensytyzacji była znana już wcześniej, a nawet wykorzystywana u ludzi, ale tylko w przypadku alloprzeszczepów i mikrochimeryzmu, czyli trwałej obecności podanych komórek w organizmie biorcy. Doniesienie autorów z Cardiff dawało nadzieję na możliwość wykorzystania desensytyzacji także w przypadku ksenoprzeszczepów. Opierając się na tym doniesieniu habilitant i jego współpracownicy podjęli szereg eksperymentów na poprzednio stosowanych modelach doświadczalnych z bioluminescencją, wykonując przeszczep komórek, zarówno allogenicznych, jak i ksenogenicznych. Do eksperymentów zostały użyte progenitorowe komórki glejowe pochodzenia ludzkiego, a oseski myszy zostały poddane desensytyzacji w sposób poprzednio opisany przez badaczy z Cardiff. Metodą bioluminescencji autorzy potwierdzili skuteczne umieszczenie ludzkich progenitorów glejowych w jamie otrzewnowej zwierząt, ale również późniejsze odrzucenie wszczepionych komórek przez gospodarza i w konsekwencji brak wystąpienia mikrochimeryzmu. W kolejnym etapie badań porównano przeżycie przeszczepu progenitorów glejowych u myszy poddanych desensytyzacji, po osiągnięciu przez nie dojrzałości, i niepoddanych procedurze desensytyzacji, nie stwierdzając między nimi żadnej istotnej różnicy. Potwierdzono to również na innych modelach; brak efektu desensytyzacji udokumentowano także w odniesieniu do ludzkich neuralnych komórek macierzystych, oraz do innego gatunku zwierząt, czyli do szczurów. Te wyniki badań zostały potwierdzone przez innych badaczy, którzy cytowali wyniki badań habilitanta i współpracowników.

Przedmiotem czwartej i piątej publikacji były poszukiwania optymalnej drogi podawania komórek do ośrodkowego układu nerwowego pod kontrolą obrazowania. Celem badań raportowanych w czwartej publikacji było wykazanie przydatności dotętniczego podawania komórek macierzystych i znalezienie czynników determinujących ich przeżycie. Idea tych badań powstała na bazie wcześniejszych doświadczeń zespołu doktora Walczaka z Uniwersytetu Johna Hopkinsa, który wykazał, że modyfikacja glejowych komórek progenitorowych w celu zwiększenia ekspresji integryn, odpowiedzialnych za przyłączanie się do komórek śródbłonna i ułatwiających przekraczanie bariery krew-mózg, jest możliwa w modelu ostrego eksperymentalnego procesu zapalnego, ale grozi mikro-udarami. Habilitant i jego współpracownicy opracowali metodę pozwalającą na uniknięcie tego zagrożenia przez zastosowanie mikro-cewnika. W badaniu na modelu szczura analizowano szybkość podawania dotętnicznej infuzji do tętnicy szyjnej wewnętrznej, a rozkład komórek macierzystych

badano za pomocą wykorzystywanej już wcześniej techniki MRI. Infuzja z zastosowaniem szybkości takiej, jaka występuje naturalnie w tej tętnicy (3ml/min) spowodowała wystąpienie mikro-udarów u większości zwierząt. Nie zmieniło się to nawet po zmianie immunogenności glejowych komórek progenitorowych myszy. Na tej podstawie habilitant wysnuł wniosek, że za wystąpienie mikro-udarów nie są odpowiedzialne zmiany zapalne związane z odrzuceniem przeszczepu i wysunął hipotezę o zaburzeniach hemodynamicznych jako powikłaniu mikrochirurgicznego zamykania światła naczynia, a po wykluczeniu i tej hipotezy, wysunął następną związaną z szybkością podawania dotętniczego jako przyczynie mikro-udarów. Ta hipoteza okazała się właściwa. Zmniejszenie szybkości podawania infuzji do 1mm/min wyeliminowało problem mikro-udarów. Oceniając uniwersalność tej obserwacji habilitant podjął próbę przeszczepiania ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych (hMSCs) zamiast stosowanych dotychczas glejowych komórek progenitorowych. Okazało się jednak, że próba przeszczepienia hMSCs spowodowała spadek szybkości mózgowego przepływu krwi i pojawienie się mikro-udarów. Odpowiedzialną za to przyczyną była wielkość hMSCs, znacznie przekraczająca rozmiary glejowych komórek progenitorowych i typowych leukocytów. Samo zatrzymywanie przepływu krwi w tożsamej tętnicy szyjnej nie zmieniło sytuacji. Poprawę, czyli brak mikro-udarów, obserwowano dopiero po zmniejszeniu liczby hMSCs. Kolejnym etapem badania było sprawdzenie, czy elementem krytycznym jest sama liczba komórek czy też wielkość całej infuzji. Okazało się, że to jednostkowa duża średnica hMSCs odgrywa znaczącą rolę w występowaniu mikro-udarów.

Dotętnicze podawanie komórek stanowi szczególne wyzwanie dla wizualizacji ich lokalizacji w czasie rzeczywistym. Publikacji wyników badań habilitanta w tym zakresie poświęcona jest publikacja nr 5. Zamiast fluoroskopii habilitant zastosował wspomnianą już wcześniej technikę MRI z użyciem nanocząsteczek tlenku żelaza jako znacznika komórkowego, który charakteryzuje się najwyższą czułością, oraz zmodyfikowaną metodę sekwencji impulsów EPI, która wykrywa nawet zmiany w ilości żelaza w tkance. Wykorzystując warunki eksperymentalne badane w poprzedniej publikacji, habilitant podawał dotętniczo komórki progenitorowe szczurom, u których 48 godzin wcześniej wykonał eksperymentalne uszkodzenie mózgu. W ten sposób wykazał, że podane komórki najpierw zasiedlają obszar peryferyjny uszkodzonej tkanki, a dopiero później centrum uszkodzenia, ale ostatecznie dystrybucja komórek w obrębie lezji nie różniła się między jej centrum a obrzeżem. Technika obrazowania komórek w czasie rzeczywistym umożliwiła ocenę dynamiki napływu komórek (wolny napływ w pierwszej dobie i znacznie przyspieszony w następnych), a tym samym na możliwość przerywania podawania komórek w pożądanym momencie, np. po ich dotarciu do obrzeża lezji. W kolejnych eksperymentach badano dynamikę napływu komórek w modelu okluzyjnego udaru mózgu u szczura i stwierdzono, że mimo zastosowania takiej samej techniki w tym modelu nie udaje się udokumentować napływu komórek do uszkodzenia – pojawiały się one w miejscach odległych od

uszkodzenia (oko), co może być związane z wyższym ciśnieniem krwi w obrębie koła Willisa, uniemożliwiającym dopływ krwi do miejsca uszkodzenia. Przyjęto hipotezę o konieczności zwiększenia szybkości infuzji komórek w celu pokonania tego ciśnienia. Podwojenie prędkości infuzji do 0.4 ml/min, umożliwiło uwidocznienie napływu przeszczepianych komórek zarówno techniką MRI jak i metodą bioluminescencji. Ten eksperyment wykazał konieczność dostosowywania prędkości infuzji komórek do wielkości i typu uszkodzenia mózgu i uświadomił potrzebę wypracowania optymalnych warunków w mózgu zanim komórki w ogóle zostaną wstrzyknięte zwierzętom, tak aby z jednej strony zmniejszyć liczbę przeszczepianych komórek, a z drugiej uniknąć potencjalnych działań niepożądanych, wynikających z niewłaściwej ich dystrybucji, co pozwoliło by na podjęcie badań u ludzi. W tym celu habilitant i jego współpracownicy przeprowadzili kolejną serię badań na większych zwierzętach (psy), którym wprowadzono mikro-cewnik do tętnicy środkowej mózgu i wstrzyknięto nanocząsteczki żelaza, które uwidoczniły zaopatrywany przez tę tętnicę obszar mózgu. Po przeszczepie komórek wykazano, że gromadzą się one dokładnie w tym samym miejscu, co podany wcześniej środek kontrastowy. Jest to, według autorów, dowodem, że ostateczną lokalizację dotętniczo podawanych komórek można przewidzieć poprzez wcześniejszą iniekcję środka kontrastowego.

Na podstawie wcześniejszych badań habilitant i jego zespół udokumentowali możliwość przechodzenia poddanych odpowiednim modyfikacjom genetycznym komórek, z tętnicy do miejsca uszkodzenia, co jest możliwe prawdopodobnie dzięki wynikającego z uszkodzenia mózgu rozszczelnienia bariery krew-mózg. Pokonanie bariery krew-mózg jest kluczowym elementem przeszczepu dotętniczego. Jedną z metod umożliwiających pokonanie tej bariery jest metoda hiperosmolarna, ale ze względu na małą precyzję i powtarzalność możliwość zastosowania jej w klinice jest ograniczona. Zespół badaczy z udziałem habilitanta podjął wyzwanie zastosowania tej metody w kontrolowanych warunkach. W pracy nr 6 zbadano możliwość oceny otwarcia bariery krew-mózg u królika, używając tej samej techniki interwencyjnej jak w pracy nr 5. Cewnik wprowadzano do tylnego kręgu mózgowego, co umożliwiło badanie trudnego obszaru pnia mózgu. Najpierw podano dotętniczo nanocząsteczki żelaza, potem 25 % roztwór mannitolu (środek hiperosmolarny), a następnie dożylnie podawano kontrast (gadolinium), aby ocenić barierę krew-mózg i błękit Evans'a, aby móc zobaczyć ten obszar mózgu w badaniu pośmiertnym. Analiza rozkładu cząsteczek żelaza w obrazowaniu MR ujawniła dużą zmienność osobniczą królików w odniesieniu do parametrów przepływu w badanych obszarze. Według habilitanta dowodzi to konieczności ustalania warunków iniekcji indywidualnie dla każdego pacjenta. Wykazano także, że nawet niewielka zmiana ułożenia końcówki cewnika może znacząco zmieniać obszar mózgu zaopatrywany przez ten cewnik. Efektem tych badań jest także wykazanie, że hiperosmolarne otwarcie bariery krew-mózg jest bezpieczne i może mieć zastosowanie u ludzi.

Siódma, ostatnia z cyklu, praca ma charakter poglądowy i zawiera szeroką analizę metod znakowania i obrazowania komórkowego koniecznego dla zapewnienia precyzyjnego ich podania. Zawiera opis zastosowania technik opartych na rezonansie magnetycznym, pozytronowej tomografii emisyjnej, promieniowaniu rtg czy izotopach (medycyna nuklearna). Podkreśla konieczność dostosowania metody obrazowania komórkowego do rodzaju uszkodzenia (patologii) i innych cech mózgu pacjenta. W publikacji przedstawiono koncepcję takiego dostosowania, określając indywidualne dla pacjenta „okno obrazowania” czyli spektrum możliwych i przydatnych specyficznie dla niego metod obrazowych. Koncepcja ta lokuje transplantację komórek, podobnie jak wiele innych metod leczenia, w tzw. medycynie spersonalizowanej.

Podsumowując osiągnięcie naukowe dr Mirosława Janowskiego można stwierdzić, że wszystkie składające się na nie 6 prac oryginalnych i 1 poglądowa, powstały z dominującym lub bardzo znaczącym udziałem habilitanta. Oceniane osiągnięcie ma szczególne znaczenie naukowe, jest w głównym nurcie badań możliwości przeszczepiania komórek do mózgu jako metody leczenia jego uszkodzenia w mechanizmie urazu, niedokrwienia czy chorób neurodegeneracyjnych. Prace powstały w kontekście wcześniejszych publikacji, zostały opublikowane w bardzo dobrych międzynarodowych czasopismach naukowych i wytyczają kierunki następnych badań. Badania zostały przeprowadzone na modelach zwierzęcych, ale ich wyniki mają bezpośrednie odniesienie do ludzi. Prace te są spójne tematycznie: wszystkie dotyczą różnych aspektów transplantacji komórek, zarówno drogi ich podawania, jak i poszukiwania łatwiejszych i szybszych niż badanie pośmiertne metod oceny przeżycia przeszczepionych komórek dla celu optymalizacji metod ochrony przeszczepu przed odrzuceniem.

Habilitant i jego współpracownicy udokumentowali bardzo duże różnice w przeżywalności przeszczepów w zależności od wielu czynników związanych z różną drogą i sposobem transplantacji, urazowość związaną z bezpośrednim wstrzykiwaniem komórek do istoty białej, przydatność i bezpieczeństwo dotętniczego podawania komórek macierzystych w określonych warunkach przepuszczalności bariery krew-mózg, a także wartość metody hiperosmolarnej w kontrolowaniu przepuszczalności tej bariery i metody bioluminescencji w obrazowaniu lokalizacji przeszczepianych komórek.

Przedstawione osiągnięcie naukowe i dotychczasowy dorobek naukowy habilitanta, odpowiadają w pełni, moim zdaniem, stawianym obecnie wymogom dla uzyskania stopnia naukowego doktora habilitowanego. Na tej podstawie przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN wniosek o dopuszczenie dr med. Mirosława Janowskiego do dalszych etapów przewodu habilitacyjnego.



Prof. dr hab. med.
ANDRZEJ SZCZUDLIK
SPECJALISTA NEUROLOG
Kraków, ul. Praska 28/13
Nr 1213145 980635136