

Ocena

dorobku oraz osiągnięcia naukowego dr Anny Otylii Sarnowskiej dla uzyskania stopnia doktora habilitowanego. Tytuł osiągnięcia: „Analiza czynników potęgujących właściwości regeneracyjne komórek macierzystych/progenitorowych stosowanych w terapii OUN”

Z ubolewaniem należy stwierdzić, że dzisiaj kandydaci nie rozpisują się na temat swoich uprzednich doświadczeń na szczeblu kariery, co niejako utrudnia ogląd kandydata, a finalnie zupełnie się go nie widuje. Odczytuje więc niektóre fakty z pierwszej strony (skąpo) Autoreferatu wnosząc, że kandydatka jest starannie wykształcona studiując w kierunku biotechnologicznym, a następnie kończąc medycynę na II Wydziale Lekarskim Akademii Medycznej w Warszawie, co niewątpliwie jest olbrzymim atutem w późniejszej pracy naukowej. W roku 2007 uzyskuje tytuł doktora nauk medycznych za pracę w zakresie biologii medycznej i również powiązaną z neurologią, w której to realizuje swoje zainteresowania także w przytłaczającej większości swoich publikacji. Do roku 2014 przechodzi poszczególne piętra zainteresowań w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN w Warszawie, by skupić się na tematyce medycyny regeneracyjnej w ośrodkowym układzie nerwowym, od roku 2006 zatrudniona jest równolegle w Klinice Neurologii i Epileptologii CMKP w Warszawie i jak można wnosić kontynuuje raczej karierę kliniczną, jakkolwiek ciągłość publikacyjna została zachowana do 2017 roku. Bez wątplenia dorobek habilitantki należy uznać za wystarczający dla uzyskania stopnia doktora habilitowanego. Wnosząc chronologicznie jest ona autorką 28 prac impaktowanych o skumulowanym współczynniku oddziaływania blisko 100, być może indeks Horscha ($H=14$) będzie się poprawiał, tak samo jak liczba cytowań (ponad 500), którą pomimo topowej i modnej tematyki należy uznać za mniej satysfakcjonującą.

Kandydatka przedstawiła niewątpliwie ciekawy zbiór prac dotyczący optymalizacji czynników mogących wpływać na zastosowanie wszczepów komórkowych do ośrodkowego układu nerwowego, jako prób terapeutycznych wobec chorób dotąd nieuleczalnych. W pierwszej z nich

zastanowiła się nad wpływem regionu (OUN) wszczepienia oraz stadium hodowlanego/zróźnicowania komórek na ich właściwości biologiczne (***Stem Cells Devel.*, 2009;18:1191-200**).

W tej publikacji kandydatka posłużyła się modelem krwi pępowinowej oraz pozyskanych z niej zawiesin ukierunkowanych neuronalnie progenitorów (HUCB-NSC) oraz zawiesin tzw. neurosfer (N-HUCB). HUCB nie są moim ulubionym modelem komórkowym, ze względu na dużą zmienność biologiczną jak i niejednoznaczny stopień metylacji w każdej z pozyskiwanych populacji (*nota bene* kandydatka nie zarysowała tego problemu). Dodatkowo jest to ksenogeniczny model komórek ludzkich wobec ośrodkowego układu centralnego szczura (hipokamp). Niemniej pewne prawidłowości dało się jednak tutaj odczytać. Poza zróźnicowaniem stadium komórkowego wyprowadzanych progenitorów neuronalnych, różnice modelowe dotyczyły okolic transplantowanych do hipokampa komórek, tj. zakrętu zębatego (DG), okolicy *cornu ammonis* (CA) oraz kory śródwęchowej (EC). Skrawki hipokampa imitowały uszkodzenie typu ostrego, tj. poddawane były transplantacji komórek już po 1 dobie od pozyskania oraz po dniach 7 od pozyskania (uszkodzenie odległe). Komórki znakowane były celem późniejszego ich obrazowania substancją CMFDA, lub też poddawano je transfekcji zielonym białkiem fluorescencyjnym.

Uwidoczniono w tym modelu ciekawy wpływ mikrośrodowiska. Na przykład transplantując na skrawki jednodniowe hipokampa komórki progenitorowe HUCB-NSC zaobserwowano, że większość z tych komórek pozostawała niezróźnicowana, o kształcie okrągłym z małą zawartością cytoplazmy i bez formujących się wypustek. Z kolei ko-kultura skrawków 7 dniowych z komórkami progenitorowymi wskazywała na znaczącą liczbę komórek przypominającą tor neuronalny o zaawansowanym wyglądzie morfologicznym jak i ekspresji adekwatnych markerów, TUJ1, MAP2 in NF200 osiągając wartości odpowiednio 49%, 43% oraz 74%. W obu przypadkach zaobserwowano pojawienie się komórek linii oligodendrocytarnej z zaznaczającą się ekspresją markerów O4 i GalC.

Innym ciekawym aspektem opublikowanej pracy były obserwacje prowadzone równolegle zarówno toru migracji jak i zróźnicowania uzyskanych

neurosfer. Tory migracyjne komórek obserwowano jedynie w przypadku ko-kultur ze skrawkami hipokampa, pozyskanymi w stanie „ostrym” (jednodniowymi). Tor migracyjny podanych neurosfer preferencyjnie prowadził z kory śródwęchowej (EC) i zakrętu zębatego (DG) do okolicy regionu *cornu ammonis* (CA), natomiast neurosfery transplantowane w okolice zakrętu zębatego (DG) migrowały poprzez *hilus* w kierunku warstwy komórek piramidalnych. Komórki podane w okolicę regionu CA migrowały w okolicę warstwy piramidalnej, zaś nigdy przeciwnie w kierunku regionu zakrętu zębatego. Neurosfery podane w okolicę regionu zębatego pozostawały w stanie spoczynkowym, zaś podane do warstwy piramidalnej regionu CA (zarówno neurosfery jak i progenitory HUCB-NSC) różnicowały się w neurony. Immunohistochemia potwierdziła ekspresję specyficznych dla toru neuronalnego markerów. Używając markera dablekortyny, białka mikrotubularnego, pojawiającego się w trakcie migracji neuroblastów udowodniono, że tzw. neurosfery transplantowane w bliskości zakrętu zębatego (DG) do skrawków 7-dniowych hipokampa aktywowały neuroblasty komórek „gospodarza”. Co interesujące, neurosfery pochodzące z ludzkich komórek krwi pępowinowej zarówno w stosunku do skrawków hipokampa jedno jak i siedmiodniowych różnicowały się nader niechętnie w kierunku astrocytów, powodując w bezpośrednim sąsiedztwie podania obniżenie liczby astrocytów, co stwierdzano poprzez obniżenie ekspresji charakterystycznych markerów, GFAP i S100 beta. Autorka konkluduje, że słaba atrakcja w kierunku ukierunkowania badanych komórek HUCB do komórek glejowych, w tym do oligodendrocytarnych polega na braku adekwatnej sygnalizacji ze strony komórek gospodarza, natomiast obserwowana astroliza może być wykorzystana jako korzystna cecha zastosowanych zawiesin pochodzących z komórek krwi pępowinowej umożliwiającą pokonywanie blizn glejowych w urazach OUN. Ta ostatnia hipoteza musi oczywiście znaleźć potwierdzenie w dalszych eksperymentach z użyciem modeli zwierzęcych.

Innym pytaniem, które zadała sobie habilitantka (opublikowano w **Exp Neurol, 2009; 215:317-327**) to fakt uczestniczenia przez komórki szpikowe (para-mezenchymalne) w strukturalnej versus parakrynowej akcji wobec OUN. Tutaj następuje zmiana sytuacji modelowej, albowiem izolowano u

szczura komórki szpiku kostnego (pula całkowita; BMSC), podobnie ze szczura izolowane były skrawki hipokampu oraz kontrolne zawiesiny komórek korowych (PrimC) pozyskiwane z mózgowia. Dodatkowo populacje BMSC po adherencji traktowano medium kompletnym, bądź pozbawionym surowicy (BMSC-SD; serum deprived). W stosunku do skrawków hipokampa powodowano jego uszkodzenie poprzez pozbawienie w pożywce glukozy w warunkach hipoksyjnych. Na tak przygotowanych skrawkach prowadzono krótkotrwałą 24-godzinną inkubację z nałożonymi zawieszinami BMSC, BMSC-SD oraz PrimC, względnie prowadzono ko-kulturę tych komórek wykluczając ich bezpośredni kontakt. W tych układach modelowych prowadzono następnie ocenę śmiertelności komórek, poziom apoptozy jak również stopień zróżnicowania posługując się stosownymi markerami komórkowymi wyznaczając w ten sposób oddziaływanie wzajemne tych układów komórkowych względem siebie. Do obserwowanych genów należały kodujące: nerwowy czynnik wzrostu, NGF beta; zasadowy fibroblastowy czynnik wzrostu, basic FGF oraz insulinopodobny czynnik wzrostu, IGF-1.

W krótkotrwałej (24-godzinnej) inkubacji 3 badanych zawieszin komórkowych na uszkodzonych skrawkach hipokampa (OGD) zaobserwowano redukcję śmiertelności komórek OHC (o ok. 16%) nakładając pule komórek BMSC i o kilka procent nakładając komórki BMSC-SD i PrimC. W ko-kulturach z użyciem skrawków OGD (po deprivacji glukozy) zaobserwowano obniżenie śmiertelności komórek w regionie *cornu ammonis* (CA) w podobnych układach odsetkowych dla odpowiednich transplantowanych populacji komórkowych (15%, 4,7% i 3,5%). Analizując stopień zróżnicowania komórek i ich potencjał migracyjny w skrawkach OHC OGD stwierdzono powierzchowne wmigrowanie populacji komórek BMSC do skrawka bez ich przemian morfologicznych, podczas gdy w populacjach komórkowych BMSC-SD oraz PrimC zaobserwowano głębokie wmigrowanie tych komórek do OHC OGD ze zmianą morfologii oraz zmanifestowaniem ekspresji genów różnicowania, w stosunku do markerów GFAP, DCX, TUJ-1. Ukierunkowując obserwację na komórki transplantowane, stwierdzono oddziaływanie OHC OGD szczególnie na populacje komórek BMSC-SD powodujące wzrost ekspresji markera GFAP i nestyny. W następnym cyklu

doświadczalnym obserwowano poziom ekspresji cytochromu c (dystrybucja zmian (efflux) z mitochondriów do cytozolu) w neuronach piramidalnych regionu CA, jak i poziom ekspresji kaspazy 3 (immunocytochemia). W tych testach zaobserwowano obniżenie dyspersji cytochromu c do cytozolu pod wpływem komórek BMSC oraz Prim C (porównywalnie dla obu tych populacji). W aspekcie aktywacji kaspazy 3 w skrawkach OHC OGD, jej obniżenie było porównywalne dla badanych populacji komórkowych (kultura), jednak podane liczebności nie harmonizują z podanymi na ryc. 3 T. Odwracając obserwacje w kierunku poziomu apoptozy w badanych populacjach BMSC i PrimC – były one porównywalne w zakresie od 6-13%.

W zakresie oceny genów zróżnicowania komórkowego, poddane kulturze badane populacje komórkowe nasilały w skrawkach hipokampu ekspresję genów IGF-1, bFGF i NGF, przy czym zwłaszcza populacja komórek BMSC-SD nasilała tę ekspresję podwyższając ją o ok. 30%, podczas gdy geny IGF-1 i bFGF nie poddawały się zmianom aktywności transkrypcyjnej porównywalnie dla populacji BMSC czy PrimC, co uważam za zaskakujące, ale nie było to przedmiotem dyskusji habilitantki. Odwrotnie badając poziomy tych genów (IGF-1, bFGF oraz NGF) w badanych populacjach komórkowych BMSC, BMSC-SD oraz PrimC największe nasilenie ekspresji tych genów obserwowano w populacji komórek BMSC-SD oraz PrimC, co korespondowało w zmianach, w morfologii tych komórek. Zatem o ile habilitantka udowodniła efekt ochronny (śmiertelność komórek, poziom apoptozy) komórek macierzystych wobec uszkodzonych struktur OUN oraz uwidoczniony został zróżnicowany efekt parakrynowy (BMSC-SD względem BMSC) tych populacji komórkowych, to z trudem można przyjąć BMSC-SD jako przykład zachowań komórek mezenchymalnych, albowiem model ten zasadniczo różni się od pracy poprzedniej z uwzględnieniem ukierunkowanych neuronalnie komórek z ludzkiej krwi pępowinowej. Tak więc, moim zdaniem, występuje tu niekompatybilność stosowanych modeli.

W następnej pracy, składającej się na przedstawione osiągnięcie (opublikowano w ***Folia Neuropathol 2013;51:103-110***) habilitantka podjęła tematykę wpływu mikrośrodowiska ośrodkowego układu nerwowego na hereogenność różnicowani się komórek progenitorowych (linii

oligodendrocytarnych). Jest to zdecydowanie najsłabsza publikacja prezentowanego cyklu i dosyć luźno związana z tematyką wiodącą osiągnięcia. W zakresie wpływu mikrośrodowiska przedstawiono 2 różne typy tkanek OUN, na których następnie prowadzono hodowle pośrednie (komórki rozdzielone od skrawków narządowych), tj. skrawki hipokampa (OHC) oraz podłużne skrawki rdzenia kręgowego. Ko-kultury hodowlane prowadzono *in vitro* przez dni 5 ze szczurzymi komórkami progenitorowymi oligodendrocytarnymi (astrocyty były odseparowane na powierzchniach adherentnych i odrzucano komórki mikroglejowe na początku 2-tygodniowej hodowli pierwotnej). Następnie weryfikowano ukierunkowanie zawiesiny pierwotnej używając markerów prekursorowych (w stosunku do komórek oligodendrocytarnych). Pojawia się ekspresja markerów świadczących o niedojrzałych oligodendrocytach (O4 i GalC), jednocześnie wykluczono komórki pochodzenia astrocytarnego (brak ekspresji markera GFAP). Wyniki wskazały także, że wywodzące się z ko-kultur zawiesiny w 99% pochodziły z komórek pozytywnych na NG2. Próbuąc ukierunkować te komórki na linię astrocytarną (dodając 1% surowicy) uzyskano populację pozytywną na obecność GFAP jedynie w 2,5%. Natomiast dodając medium kondycjonowane z hodowli skrawków hipokampa oraz rdzenia kręgowego osiągnęto 18% komórek pozytywnych na marker GFAP. Jednakże analizując ekspresję genów troficznych i cytokin metodą macierzy funkcjonalnych wykazano różnice w tychże wyodrębniając pewne osobne specyficzności dla tkanki hipokampa (czynniki troficzne charakterystyczne dla mózgu – BDNF; nerwowy czynnik wzrostu – NGF; rzęskowy czynnik neurotroficzny, CTNF; glejowy neurotroficzny czynnik wzrostu, GDNF; neurotrofina 5, NTF5; fibroblastowy czynnik wzrostu nr 9, FGF9; aktywator transdukcji, STAT4 i czynnik dojrzewania gleju GMF, izoformy alfa i beta). W przypadku dominujących czynników w skrawkach rdzenia kręgowego wyodrębniono, nerwowy czynnik wzrostu VGF oraz neurotrofinę 3. Autorka interpretuje te wyniki w kierunku ekspresji korzystnych neuroprotekcynie czynników NGF, BDNF, CTNF i GDNF pochodzących zwłaszcza z hipokampa wobec czynników pro-astrocytarnych mogących zakłócić organizację tkankową OUN poprzez powstawanie blizn astrocytarnych. Niemniej proszę zważyć, że kierunek pro-

astrocytarny przyjmowały komórki poddane wpływowi medium kondycjonowanego z nad obu typów ko-kultur tkankowych, tj. z użyciem hipokampa jak i rdzenia kręgowego!!

Następną metodologiczną „wprawką” habilitantki jest zbiór doświadczeń nad kulturami tkankowymi pochodzącymi ze skrawków narządowych pobranych podłużnie z rdzenia kręgowego szczura (opublikowano w ***Stem Cells Internat 2015***). Porównawczo pobierano skrawki od szczurów 5-7 dniowych oraz osobników dorosłych (ok. 8-tygodniowych). Opisano szczegółowo problematykę metodologiczną oraz skalę trudności wynikającą z różnicy wieku zwierząt laboratoryjnych. Zwrócono uwagę na zachowanie cytoarchitektoniki hodowli skrawków narządowych jak i zachowanie orientacji grzbietowo-brzuszej. Niemniej skrawki od osobników dorosłych pozwalają na obserwacje 4-5 tygodniowe, zaś skrawki od osobników dorosłych na 1 tydzień. W obu przypadkach jest to okres zbyt krótki dla obserwacji pro-regeneracyjnych włókien nerwowych, ale wystarczający dla oceny neuroprotekcji. Aby ocenić wpływ środowiska OUN dla celów krótkiej transplantacji ludzkich komórek krwi pepowinowej, linii HUCB-NSC i/lub szczurzycych progenitorów oligodendrocytarnych pozyskano je w odpowiednio opisanych wcześniej technikach, a następnie przystąpiono do krótkoterminowej inkubacji lub ko-kultur pośrednich (medium przedziela zawiesinę komórkowa od skrawka narządowego). Przy ocenie immunohistochemicznej wykonanej po krótkiej inkubacji wobec komórek HUCB-NSC wykazano obecność markerów neuronalnych (TUJ1) jak i astrocytarnych S100beta. W identycznych doświadczeniach z ko-kulturami pośrednimi wykazano w HUCB-NSC intensywną ekspresję markera TUJ1. W porównaniu ze skrawkami pozyskanymi od osobników dorosłych, skrawki rdzenia kręgowego od osobników młodych wykazywały znacznie bardziej nasiloną ekspresję pro-neuronalną TUJ1/NF200, a osobniki dorosłe nasilenie markera pro-oligodendrocytarnego NG2. Nie było różnic w stosunku do markerów pro-astrocytarnych. Z kolei porównując oddziaływanie mikrośrodowiska hipokampa w stosunku do rdzenia kręgowego zwraca uwagę ukierunkowanie na dojrzewanie w kierunku pro-neuronalnym (TUJ1) przy pewnym przyspieszeniu wzrostu różnicowania

oligodendrocytarnego (GalC), zaś w przypadku środowiska skrawków pochodzenia rdzeniowego zdecydowanie niedojrzałych form oligodendrocytarnych. Te różnice w ukierunkowaniu dojrzewania umożliwiane przez mikrośrodowisko OUN powinny być brane pod uwagę przy przygotowywaniu komórek macierzystych do możliwych wszczepów/terapii komórkowych w odpowiednich strukturach OUN.

Kolejna publikacja (opublikowano w ***Mol Neurobiol*, 2017**) wprowadza najwięcej niepokoju do analizowanego cyklu prac składającego się na osiągnięcie promocyjne. W streszczeniu tej pracy autorzy donoszą (ostatni autor to habilitantka), o zastosowaniu ludzkich komórek mezenchymalnych, pochodzących z galarety Whartona na prowadzone (i wielokrotnie w tym osiągnięciu się przewijające) ko-kultury komórek macierzystych ze skrawkami hipokampa, w tym z tkanką OUN uszkodzoną pozbawieniem w medium glukozy, w warunkach hipoksyjnych. Wyprowadzone wnioski na temat ewentualnej neuroprotekcji komórek (KM) pochodzących z galarety Whartona wobec uszkodzonych komórek hipokampa nie sprawdzają się jednak w dalszym ciągu tej pracy, zwłaszcza w odniesieniu do postulowanych różnic w jakości komórek pomiędzy ich pasażami, a tzw. kulturami świeżymi, zaś dyskusja została poprowadzona całkowicie „obok” uzyskanych wyników. A zatem, teoretycznie obserwacje miały się rozgrywać wobec ko-kultur skrawków uszkodzonego hipokampa, a „świeżymi” fragmentami tkanki sznurów pępowinowych i MSC z ich izolowanymi (1-szy a 4-ty pasaż hodowli *in vitro*, lub też nie rozumiem kodów zastosowanych w tej pracy). Autorki klarownie podają miejsce pozyskiwania fragmentów tkanki, dla uniknięcia kontaminacji innymi typami komórek, a następnie opisują pozyskiwanie zawiesin komórkowych MSC. Opisują szczegółowo zarówno sposób pozyskiwania ludzkich zawiesin komórek MSC jak i skrawków tkankowych szurzego hipokampa. Podają też warunki tzw. hodowli pośredniej, a następnie barwienia immunocytochemicznego, testu immunosorbentowego i aktywności transkrypcyjnej poszczególnych badanych czynników/genów, które uważają za kluczowe dla potwierdzenia potencjalnie uzyskiwanej neuroprotekcji, przez komórki pochodzące z galarety Whartona. W prowadzonych ko-kulturach zaobserwowano różnice w neuroprotekcji wobec

komórek hipokampa (badana śmiertelność komórek) pomiędzy świeżymi fragmentami tkanki galarety i KM z pierwszego pasaży wobec komórek mezenchymalnych pozyskanych z pasaży 4-tego, ale nie wykazano istotnych różnic pomiędzy oddziaływaniem dwóch pierwszych populacji komórkowo-tkankowych, co przeczy idei Abstraktu. Immunohistochemia przedstawiona na rycinie 2 tej pracy, również nie potwierdza tego przewodniego motta, dokumentując jedynie, że świeże fragmenty WJ przedstawiały minimalne ilości komórek z nisko ekspresjonowanymi markerami linii neuronalno-glejiowych (GFAP, NF200, NG2), które intensywnie przyrastały po ko-kulturze ze skrawkami hipokampa i jeszcze intensywniej po ko-kulturze z tkanką OHC uszkodzoną brakiem glukozy w medium i hipoksją (OHC OGD). Nie ma tu jednak bezpośredniego porównania z aktywnością komórek mezenchymalnych w stosunku do późniejszych pasaży. Takie porównanie można byłoby suponować z rycin 3 i 4, tam mamy jednak porównania wobec KM z pierwszego pasaży w stosunku do ko-kultur ze skrawkami hipokampa, a na rycinie 4, KM z 4 pasaży hodowli wobec ko-kultur z OHC. Nie ma tu bezpośredniego porównania funkcji KM z tzw. fragmentami tkanek świeżych galarety Whartona (WJ). Charakterystyczne markery komórek mezenchymalnych, fibronektyna i wimentyna nie różniły się w pasaży 1-szym w ekspresji wobec ko-kultur z OHC oraz OHC OGD. Jednak marker oligodendrocytarny NG2 wystąpił w 17% populacji komórek WJ i wzrósł istotnie w hodowli pośredniej z OHC i OHC OGD do ok. 28%. Specyficzne barwienie na nestynę (komórki neuronalne) ujawniło 13% pozytywnych komórek w kontrolnej monowarstwie wobec 30 i 34% pozytywnych po ko-kulturze z OHC oraz OHC OGD. Równolegle neuronalny marker NF200, wystąpił w kontrolnych komórkach galarety Whartona w 22,5% i wzrastał do 34% i 36,5% w ko-kulturze z OHC oraz OHC OGD. Marker bardziej dojrzałych komórek neuronalnych TUJ1 wyniósł w populacji komórek kontrolnych 0,5% i wzrastał do 6% w ko-kulturze z OHC OGD, podobnie marker proliferacyjny Ki67 miał poziom zerowy w hodowlach monowarstwowych i wzrastał do 12,5% po ko-kulturze OHC OGD.

Analizując KM z 4-tego pasaży (ryc. 4) odnotowujemy, podobnie jak w przypadku komórek z 1-szego pasaży) brak różnic w ekspresji fibronektyny i

wimentyny w hodowlach pośrednich. Liczebności dla markera oligodendrocytarnego, NG2, wynosiły dla kontrolnej monowarstwy, komórek pozytywnych w 13,5% (czyli podobnie jak dla komórek z pasażu 1-szego) i wzrastał do 27% w hodowlach z OHC i 29% komórek pozytywnych w ko-kulturach z OHC OGD (czyli całkiem podobnie jak w komórkach KM z pasażu 1-szego). Ekspresja nestyny wynosiła w monowarstwie – 24,5% (czyli znacznie wyżej niż w kontrolach KM z 1-szego pasażu) i wzrastała do 32% i 33,5% w ko-kulturach z OHC oraz OHC OGD (czyli prawie identycznie jak w komórkach KM z pasażu 1-szego). Barwienie markera NF200 ujawniło 25,5% komórek pozytywnych w hodowli kontrolnej i wzrost do 39% oraz 40% w ko-kulturach z OHC oraz OHC OGD, czyli więcej niż w odnośnych hodowlach z komórkami KM z pasażu 1-szego). Marker TUJ1 występował w 17% z komórek z monowarstwy kontrolnej i wzrastał do 25% w ko-kulturach ze skrawkami hipokampa (czyli znacznie wyżej niż w komórkach KM z pasażu 1-szego). Podobnie wyższe poziomy zaobserwowano w stosunku do markera proliferacyjnego Ki67 (w komórkach KM z pasażu 4-tego). Wyższy poziom komórek z markerem GFAP w KM w 4-tym pasażu mógł być traktowany dwójako, jednak na poziomie prób z neuroptotekcją nie może być jednoznacznie odczytywany jako negatywny.

Porównując bardziej bezpośrednio komórki KM z pasażu 1-szego wobec tych z pasażu 4-tego można było zaobserwować wyższy poziom fibronektyny (dla KM z pasażu 1-szego) ale porównywalny u obu typów KM poziom wimentyny. Jednoznacznie należy stwierdzić, że poziomy markerów neuronalnych, zwłaszcza w odniesieniu do markera TUJ1 były istotnie wyższe dla komórek KM z pasażu 4-tego, podobnie jednoznacznie układały się markery proliferacyjne Ki67. Czy to oznacza słabszy potencjał neuroprotekcyny tych komórek – powątpiewam!

Dalej podążając za myślą autorów wobec czynników wydzielanych do mediów hodowlanych, zwłaszcza w aspekcie ko-kultur oraz komórek WJ czy też WJ-MSK z 1-szego, bądź 4-tego pasażu również nie znajduję dowodu na myśl przewodnią autorów. W stosunku na przykład do czynnika hVEGF, zaobserwowano znamienne przyrost tego czynnika w ko-kulturach WJ ze skrawkami hipokampa i znamienne dla ko-kultur z użyciem KM z 4-tego

pasażu (ale nie z KM z 1-szego pasażu). I obserwacja ta nie potwierdza postawionej tezy o wyższości komórek świeżych. Podobnie nie dostarcza jej profil wydzielanej IL-6, co prawda nie indukują jej ko-kultury hipokampa z komórkami WJ oraz KM z 1-szego pasażu, w przeciwieństwie do komórek z pasażu 4-tego, ale czy to jest dowód na ich wyższość neuroprotekcijną, trudno takiego dowodu się doszukać. Nasiloną sekrecję w hodowlach z użyciem KM z 4-go pasażu, wobec pozostałych badanych populacji komórkowych stwierdzono dla czynników NGF beta, TGF beta, IL-2, IL-10, FGF beta, IGF-1. Poza kontrowersyjną cytokiną IL-2 nie uważałbym takiej konfiguracji za objawiającą słabszy potencjał neuroprotekcijny.

Podobnie kontrowersyjne wyniki uzyskano dla ko-kultur analizowanych na przykładzie wzorów ekspresji. W skrawkach hipokampa po uszkodzeniu (OHC OGD) jedynymi genami cechującymi się wzrostem ekspresji były pro-apoptotyczne Bax i kaspaza 3! Natomiast stwierdzono korelację pomiędzy oddziaływaniem neuroprotekcijnym przez świeże komórki WJ a wzorem transkrypcji genów troficznym EGF, GDNF, VEGF, FGF i wszystko byłoby dobrze, gdyby nie nieoczekiwany wzrost ekspresji genu Bax.

Autorki tej pracy, w tym habilitantka, nie potrafiły odpowiednio przedyskutować uzyskanych przez siebie wyników.

Moim zdaniem najbardziej konceptualnie dojrzałą pracą (opublikowano w ***Cell Transplantation***, 2013;22:867-882) jest raport z użyciem enkapsulowanych ludzkich komórek mezenchymalnych, pozyskanych z galarety Whartona (hUCMSC) i wprowadzonych do bioaktywnych i biodegradowalnych rusztowań 3-D, które następnie implantowano do mózgu szczurzego lub skrawków szczurzego hipokampa – obie struktury mózgowe były celowo uszkodzane. Enkapsulowane ludzkie KM wykazywały pewne właściwości funkcjonalne, ponad to powodowały neutralność układu immunologicznego, a następnie ryszowania ulegały spontanicznej biodegradacji nie powiększając okolicznego odczynu odpornościowego. Wykonywano 2 rodzaje rusztowań, opartego na dekstranie i lamininie oraz żelatynie i lamininie. Rusztowania dostrajane były do wielkości komórek, w zależności od wielkości porów, pozwalając na swobodną ich kolonizację.

Następnie izolowano KM spośród tkanek galarety Whartona, i co ważne, komórek nie pulowano, stanowiły one odrębne zawiesiny pierwotne. Zawiesiny hUCMSC poddawano charakterystyce cytometrycznej i immunocytochemicznej. Charakterystyka ta wykazała prawidłowy skład badanych populacji, jako CD133 i CD45 negatywnych oraz CD 90, CD 73 i CD 44 pozytywnych. Oprócz tego potwierdzono cytochemicznie obecność wimentyny, nestyny i beta tubuliny III. Następnie zweryfikowano strukturę porów oraz kolonizację i zdolność do proliferacji hUCMSC w rusztowaniach dekstranowo-lamininowych oraz żelatynowo-lamininowych. Wykazano wyższość struktur żelatynowo-lamininowych. Struktury sieciowano przy pomocy glutaraldehydu odkrywając, że gęste sieciowanie sprzyjało stabilizacji mechanicznej rusztowania jak i dostosowując wielkość porów do wielkości komórek. Następnie udowodniono, że w rusztowaniach, komórki w trakcie 7-dmiodniowej inkubacji, żywo proliferowały wykazując obecność markera Ki67 oraz marker zróznicowania neuropitelialnego – nestyny a także GFAP – wskazującego na różnicowanie w kierunku gleju astrocytarnego. Po 2 tygodniach hodowli *in vitro* zaobserwowano obecność bardziej dojrzałych markerów neuronalnych (MAP2) i glejowych (S100 beta). Stwierdzono, że biorusztowania żelatynowo-lamininowe były plastyczne, i nie immunogenne w odróżnieniu od polisacharydów dekstranowych pochodzenia bakteryjnego. Żywotność komórek w biorusztowaniach wynosiła od 75-80%.

Następnie odpowiednio przygotowano struktury badanego OUN. Oprócz tradycyjnego modelu skrawków hipokampa uszkodzonych deprywacją glukozy w warunkach hipoksyjnych (OHC OGD) implantacji komórek poddawano półkule mózgowe uszkodzone ouabainą. Następnie prowadzono implantacje komórek w biorusztowaniach oceniając stosowne markery immunocytochemicznie oraz na obecność aktywnych transkrypcji charakterystycznych genów markerowych.

Porównywano wzbudzenie odpowiedzi immunologicznej po implantacji hUCMSC zarówno w rusztowaniach dekstranowo-lamininowych jak i żelatynowo-lamininowych do skrawków OHC OGD. Stwierdzono przy pomocy immunofluorescencji znacznie wyższy stopień kolonizacji komórek pozytywnych na ED1 (makrofagi) oraz GFAP (pochodzenie astrocytarne) w

rusztowaniach dekstranowo-lamininowych w stosunku do żelatynowych. Dodatkowo wokół rusztowań DL wykryto znaczne liczby komórek apoptotycznych i nekrotycznych. Astrogliaza (cechowana obecnością markera GFAP) była znacznie niższa w skrawkach hipokampa OHC OGD, gdy komórki mezenchymalne znajdowały się wewnątrz rusztowań. Jednocześnie stwierdzano osłabienie aktywności makrofagowo-mikroglejowej śledząc osłabienie intensywności markerów ED1, i Iba1 w skrawkach OHC OGD po implantacji hUBMSC otoczonych biorusztowaniami w otoczeniu uszkodzonych skrawków kontrolnych hipokampa. Zaobserwowano znamienne zmniejszenie aktywności mRNA dla genu kodującego IL-6, w stosunku do implantowanych rusztowań pustych, przy czym rusztowanie żelatynowo-lamininowe aktywowało gen IL-6 dwukrotnie słabiej, a ten z kolei był dwukrotnie słabiej ekspresjonowany stosując MSC enkapsulowane w żelatyno-lamininie.

Następnie zbadano efekt w stosunku do uszkodzonej ouabainą tkanki mózgowej stosując zawieszynę hUBMSC oraz hUBMSC w rusztowaniach żelatynowo-lamininowych. Reakcję tę obserwowano w stosunku do kontrolnych skrawków mózgowych jak i skrawków uszkodzanych przyżyciowo ouabainą. Rytm obserwacji polegał na wprowadzeniu do OUN rusztowań pustych, zawieszyn pierwotnych hUBMSC oraz rusztowań zawierających hUBMSC. Barwienie wykonywano na obecność komórek ludzkich (NuMa – specyficzne barwienie ludzkich jąder komórkowych) oraz obecność makrofagów ED1 i markera GFAP aktywacji gleju. (Stosowano równoległe barwienie obrazujące komórki ludzkie). W obu przypadkach, ale zwłaszcza w stosunku do skrawków mózgowych uszkodzonych ouabainą, najmniejszą aktywację i obecność makrofagów oraz komórek gleju GFAP-pozytywnych zaobserwowano stosując enkapsulację hUBMSC. Niewiele komórek hUBMSC pozostających w obrębie biorusztowań wykazywało obecność markerów charakterystycznych dla prekursorów astrocytarnych (GFAP) czy oligodendrocytarnych (A285, O4). Jednak enkapsulowane hUBMSC wprowadzały zmianę do patofizjologii hodowli tkankowej mózgu, było tam zauważalnie mniej infiltrujących makrofagów (identyfikowanych przy pomocy ED1) w porównaniu do implantacji pustymi rusztowaniami.

Dochodziło też do utworzenia przestrzeni neuralnej wokół biorusztowań, w których aktywacja makrofagowo-glejowa była wygaszona. Dodatkowo przy pomocy zymografii *in situ* wykazano aktywność proteolityczną metaloproteinaz 2 i 9 w skrawkach mózgowych uszkodzonych ouabainą a w biorusztowaniach żelatynowych wypełnionych hUBMSC znacząco wyżej niż dla biorusztowań dekstranowych, co potwierdzało wyższość rusztowań opartych o biodegradowalny kolagen. W uszkodzonej tkance mózgowej szczura obserwowano aktywność metaloproteinaz wzmocnioną transplantacją hUBMSC enkapsulowanych żelatynowo, a aktywacja MMP-2 była szczególnie widoczna pomiędzy komórkami otaczającymi rusztowanie i wewnątrz rusztowań. Rycina obrazująca to zjawisko jest jednak nader niejasno przedstawiona, podobnie jak i następna przedstawiająca hUBMSC po roztrawieniu rusztowań i brak jest przynajmniej strzałek objaśniających czytelnikowi zagmatwany obraz tkankowy. Niemniej na ryc. 7 zobrazowano pojedyncze komórki CD 73 i CD 90-pozytywne w miejscu implantacji, w 10 dni po wprowadzeniu ich do skrawków, a struktury rusztowania były zastępowane pozakomórkową fibronektyną zaświadczającą o biodegradacji rusztowań, która jak widać nie wzbudzała odczynu odpornościowego.

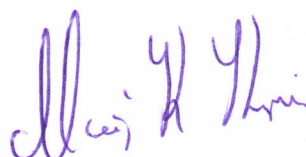
Pomijając te niedoskonałości techniczne, uważam tę publikację za najbardziej wartościową z całego cyklu, jakkolwiek funkcjonalność hUBMSC nie została tu w pełni udokumentowana wobec fascynującego modelu uszkodzonych struktur OUN, który miałby szanse być dalej prowadzony w warunkach *in situ* i/lub na żywych zwierzętach.

W efekcie w osiągnięciu, stanowiącym podstawę promocyjną dla procedowania przewodu habilitacyjnego, dostrzegam dosyć luźno związany ze sobą zbiór publikacji przy kilku zmieniających się układach modelowych komórek macierzystych, tj. pozyskiwanych z krwi pępowinowej, szpiku kostnego, galarety Whartona. W niektórych przypadkach wyciągane są wnioski nieprawidłowe, co w znacznej mierze dotyczy potencjalnego wpływu neuroprotekcyjnego uzyskiwanego przy pomocy komórek pozyskiwanych z galarety Whartona. Wydaje się, że wyniki nie potwierdzają wcześniej przyjętej tezy i wzdragał bym się twierdzić, że im komórki mniej zróżnicowane tym

lepiej. Wydaje mi się również, że w świetle listy publikacji przedstawionej przez habilitantkę dałoby się wybrać znacznie bardziej spójny cykl prac. Biorąc pod uwagę, jednak cały istotny dorobek publikacyjny habilitantki, w tym fakt udziału w 12 projektach badawczych (w 2 była kierownikiem), a także aktywny udział aż w 143 doniesieniach zjazdowych, uczestnictwo w międzynarodowych projektach badawczych, dorobek dydaktyczny i popularyzatorski a także udział w promowaniu młodych pracowników nauki (4 magistrów) oraz tzw. promotorstwo pomocnicze w 3 dalszych przypadkach, należy postrzegać kandydatkę jako doświadczonego i dojrzałego pracownika naukowego. W dalszym aspekcie swojej kariery, habilitantka może okazać się ważnym ogniwem dydaktycznym i naukowym na niwie medycyny klinicznej, nie stroniąc od współpracy międzynarodowej.

Reasumując przedstawiona podstawa promocyjna wydaje się być, moim zdaniem, wystarczająca w świetle obowiązujących przepisów i wymogów dla dopuszczenia dr n. med. Anny Sarnowskiej do dalszych etapów postępowania habilitacyjnego i taki wniosek przedkładam do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN w Warszawie.

Poznań, dnia 24 lipca 2018 roku



Maciej Kurpisz