



WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Zakład Medycyny Regeneracyjnej

Warszawa, 3 września 2018 roku

**Recenzja dorobku naukowo-dydaktycznego
doktor nauk medycznych Anny Otylii Sarnowskiej**

Tytuł osiągnięcia naukowego: „Analiza czynników potęgujących właściwości regeneracyjne komórek macierzystych/progenitorowych stosowanych w terapii OUN”.

Dr n. med. Anna Otylia Sarnowska uzyskała w 2000 r. stopień magistra nauk biologicznych, specjalność biotechnologia, na Wydziale Biologii, Uniwersytetu Warszawskiego. Równocześnie w 2002 r. kandydatka uzyskała tytuł lekarza medycyny, na II Wydziale Lekarskim, Akademii Medycznej w Warszawie. Następnie w 2007 r. obroniła pracę doktorską pt. „Mechanizmy działania wybranych związków neuroprotektynowych w uszkodzeniu ischemicznym neuronów sektora CA1 hipokampa”, w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego, PAN – (promotor, prof. Krystyna Domańska-Janik) i otrzymała tytuł doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej. W 2013 r. dr Sarnowska uzyskała tytuł specjalisty neurologa.

Habilitantka w latach 2000-2014 była zatrudniona w Zakładzie Neurobiologii Naprawczej; IMDiK PAN im. M. Mossakowskiego w Warszawie jako asystent, a następnie adiunkt. Od 2014 do chwili obecnej pracuje jako adiunkt w Pracowni Bioinżynierii Komórek Macierzystych; IMDiK PAN im. M. Mossakowskiego w Warszawie oraz jednocześnie jest kierownikiem Platformy Badań Translacyjnych Medycyny Regeneracyjnej; IMDiK PAN im. M. Mossakowskiego w Warszawie, W latach 2002-2003 zatrudniona była jako stażysta w Szpitalu CSK MSWiA ul. Wołoska, a od 2006 r. do chwili obecnej jest starszym asystentem w Klinice Neurologii i Epileptologii CMKP SPSK im. Prof. W. Orłowskiego w Warszawie.

Ocena aktywności naukowej habilitantki

Dorobek habilitantki wg przedłożonego do oceny autoreferatu oraz analizy biometrycznej Biblioteki Centrum medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk z **28** prac z listy Filadelfijskiej o łącznym współczynniku oddziaływania **91,282** (649 punkty KBN/MNiSW), 1 rozdziału w podręcznikach międzynarodowych oraz 3 rozdziałów w podręcznikach krajowych. Habilitantka opublikowała również **4** prace w pismach nie impaktowanych. Dorobek habilitantki składa się również z ze **163** streszczeń ze zjazdów międzynarodowych i 6 ze zjazdów krajowych. Liczba cytowań według Web of Science Ciore Collection wynosi **611** (566 bez autocytowań) a Indeks Hirscha = **14**.

Dotychczasowy przebieg aktywności naukowo klinicznej habilitantki

Pracę naukową dr n. med. Anna Otylia Sarnowska rozpoczęła w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN w Zakładzie Neurobiologii Naprawczej w 2000r, po zakończeniu studiów na Wydziale Biologii UW, będąc jednocześnie studentką na II Wydziale Lekarskim WUM. Celem nadrzędnym prowadzonych wówczas badań było poznanie mechanizmów opóźnionej śmierci neuronów oraz znalezienie substancji o potencjale neuroprotekcyjnym w modelach przejściowego niedokrwienia mózgu. Badania te zaowocowały rozprawa doktorska pt. „*Mechanizmy działania wybranych związków neuroprotekcyjnych na modelach uszkodzeń ischemicznych neuronów sektora CA1 organotypowej hodowli hipokampa szczura*”. Badanie te dotyczyły m.in. opracowania modelu uszkodzenia wolnorodnikowego i ekscytotoksycznego *ex vivo* na organotypowej hodowli skrawków hipokampa szczura, Na powyższym modelu sprawdzano efekt neuroprotekcyjny wybranych czynników (cyklosporyna A, diazepam, minocyklina) oraz badano szlaki sygnałowe zaangażowane w ich działanie. Badania dotyczące neuroprotekcji i mechanizmów aktywowanych po epizodzie niedokrwienia mózgu są nadal kontynuowane przez habilitantkę, która bada różne izoform kinaz białkowych C (PKC) związanych z mitochondriami w procesach prowadzących do poischemicznej eliminacji neuronów.



WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Zakład Medycyny Regeneracyjnej

Należy podkreślić, że dr n. med. Anna Otylia Sarnowska od początku pracy w Medycynie Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN prowadziła doświadczenia dotyczące zastosowania komórek macierzystych/progenitorowych (KM) wyizolowanych z krwi pępowinowej w chorobach neurodegeneracyjnych mózgu.

Po obronie doktoratu w 2007 r dr n. med. Anna Otylia Sarnowska odbyła roczny staż w ramach stypendium im. Marii Curie-Skłodowskiej w Leibniz Institute for Neurobiology w Magdeburgu. W trakcie stażu zdobyła doświadczenie w izolacji, hodowli i charakterystyce mezenchymalnych komórek macierzystych (MSC) izolowanych ze szpiku, metod biologii molekularnej oraz metod obrazowania przeżyciowego skrawków pobranych z tkanki nerwowej. Po powrocie do Zakładu Neurobiologii Naprawczej w roku 2009 habilitantka kontynuowała badania związane z otrzymywaniem MSC z różnych źródeł, jak również nad sposobami ich różnicowania i transplantacji. Prace te dotyczyły m.in. izolacji z heterogennej populacji MSC, subpopulacji pluripotencjalnych komórek macierzystych poprzez modulowanie czynników środowiskowe takich jak stężenie parcjalne tlenu oraz porównując różne metody izolacji komórek.

Habilitantka równolegle z prowadzeniem badań podstawowych, po zakończeniu studiów medycznych, w 2002 r rozpoczęła pracę jako klinicysta a w 2013r. otrzymała tytuł specjalisty neurologa. Jako lekarz, spotykający się na co dzień z pacjentami po udarach czy urazach mózgu często z dużym stopniem niepełnosprawności dążyła do wprowadzenia terapii komórkowej do Kliniki. W 2015 roku, IMDiK PAN otrzymał dodatkowe fundusze przeznaczone na utworzenie Platformy Badań Translacyjnych w zakresie Medycyny Regeneracyjnej (PBTMR), w której habilitantka objęła kierownictwo. We współpracy z Kliniką Neurochirurgii i Neurologii WUM opracowane zostały wstępne kryteria włączenia pacjentów z ALS do eksperymentalnej terapii regeneracyjnej z zastosowaniem mezenchymalnych komórek macierzystych izolowanych z tkanki tłuszczowej (ADRC-adipose derived stem cells), jak również ustalono badania konieczne do oceny bezpieczeństwa i efektywności zastosowanej terapii.

Pracując w Klinice Neurologii i Epileptologii CMKP oraz w IMDiK PAN dr n. med. Anna Otylia Sarnowska prowadziła zajęcia dydaktyczne z zakresu neurologii dla rezydentów oraz z zakresu neurobiologii dla doktorantów. Była również opiekunem 3 prac magisterskich oraz

promotorem pomocniczym 2 prac doktorskich. Oprócz pracy naukowej bierze aktywny udział w propagowaniu wiedzy dotyczącej racjonalnego zastosowania komórek macierzystych w terapii, zarówno w trakcie popularnonaukowych spotkań np. na Festiwalu Nauki, jak również uczestniczy w pracach towarzystw naukowych związanych z wprowadzeniem terapii komórkowej do Kliniki (jako sekretarz Zespołu ds. Terapii Komórkowej Komitetu Neurologii PAN, oraz członek Komitetu Naukowego międzynarodowego towarzystwa „Neurorestoratology”).

W swojej dotychczasowej pracy habilitantka była finansowana w ramach 10 polskich projektów badawczych finansowanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, Narodowe Centrum Nauki i Narodowe Centrum Badań i Rozwoju. W dwóch z tych grantów była kierownikiem, w dwóch kolejnych (konsorcyjnych) osobą odpowiedzialną za jedno z zadań. Kolejne 3 projekty, w których była wykonawcą, miały charakter międzynarodowy.

Ocena cyklu 6 oryginalnych prac naukowych habilitantki, opublikowanych w recenzowanych czasopismach, znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR), o sumarycznym współczynniku oddziaływania IF = 23,174 punktacji MNiSW =163 i liczbie cytowań = 62.

W pracach wymienionych poniżej, które wchodziły w skład odkrycia naukowego udział doktor nauk medycznych Anny Otylii Sarnowskiej był wiodący co jest potwierdzone listami współautorów.

1. Dabrowska S, Sypecka J, Jablonska A, Strojek L, Wielgos M, Domanska-Janik K, **Sarnowska A**. Neuroprotective Potential and Paracrine Activity of Stromal Vs. Culture-Expanded hMSC Derived from Wharton Jelly under Co-Cultured with Hippocampal Organotypic Slices. *Mol Neurobiol*. 2017 Nov 13. IF: 6,190; MNiSW: 40; liczba cytowań: 0
2. Sypecka J, Koniusz S, Kawalec M, **Sarnowska A**. The organotypic longitudinal spinal cord slice culture for stem cell study. *Stem Cells Int*. 2015;2015:471216. IF: 3,687; MNiSW: 20; liczba cytowań: 1
3. **Sarnowska A**, Jablonska A, Jurga M, Dainiak M, Strojek L, Drela K, Wright K, Tripathi A, Kumar A, Jungvid H, Lukomska B, Forraz N, McGuckin C, Domanska-Janik K. Encapsulation of



WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Zakład Medycyny Regeneracyjnej

mesenchymal stem cells by bioscaffolds protects cell survival and attenuates neuroinflammatory reaction in injured brain tissue after transplantation. *Cell Transplant.* 2013;22 Suppl 1:S67-82. IF: 3,570; NiSW: 35; liczba cytowań: 8

4. Sypecka J, **Sarnowska A**. Heterogeneity of local tissue microenvironment influences differentiation of oligodendroglial progenitors. *Folia Neuropathol.* 2013;51(2):103-10. IF: 1,667; MNiSW: 20; liczba cytowań: 7

5. **Sarnowska A**, Braun H, Sauerzweig S, Reymann KG. The neuroprotective effect of bone marrow stem cells is not dependent on direct cell contact with hypoxic injured tissue. *Exp Neurol.* 2009 Feb;215(2):317-27. IF: 3,914; MNiSW: 24; liczba cytowań: 37

6. **Sarnowska A**, Jurga M, Buzanska L, Filipkowski RK, Duniec K, Domanska-Janik K. Bilateral interaction between cord blood-derived human neural stem cells and organotypic rat hippocampal culture. *Stem Cells Dev.* 2009 Oct;18(8):1191-200. IF: 4,146; MNiSW: 24; liczba cytowań: 9

Terapia komórkami macierzystymi OUN jest nadal w fazie początkowej i dlatego prace prowadzone przez habilitantkę mają szczególne znaczenie poznawcze. Poszukuje się bowiem optymalnej komórki macierzystej mogącej różnicować się w tkankę nerwową oraz ścierają się tutaj różne poglądy, często warunkowane względami patentowymi i komercyjnymi. Komórkami, które próbuje się stosować są m.in MSC, które poprzez uwalnianie szeregu czynników działają głównie parakrynnie na uszkodzone tkanki. Pomędzy tymi komórkami mogą się także znajdować bardzo rzadkie komórki o szerszym potencjale różnicowania niż komórki MSC, które tak naprawdę wg. obecnych zaleceń powinno się poprawnie nazywać komórkami mezenchymalnymi podścieliska (mesenchymal stroma cells).

Jak habilitantka przyznaje obecnie w badaniach klinicznych zastosowanie znalazły głównie MSC ze względu na łatwość dostępu, brak kontrowersji etycznych oraz stosunkowo duże bezpieczeństwo przeszczepów, w tym również allogenicznych. Habilitantka również słusznie podkreśla dwuznaczność nazywania MSC komórkami macierzystymi oraz to, że komórki pozyskiwane ze szpiku kostnego, tkanki tłuszczowej lub krwi pępowinowej stanowią heterogenną frakcję stromalną (podścieliskową) lub w przypadku krwi pępowinowej subpopulację jednojądrzastych komórek. Możliwość otrzymania drogą długotrwałej selekcji pełnego różnicowania neuralnego komórek jednojądrzastych krwi pępowinowej została wykazano po raz pierwszy ponad 15 lat temu (Bużańska i wsp. 2002).

W przeprowadzonych badaniach wchodzących w skład odkrycia naukowego dr n. med. Anna Otylia Sarnowska starała się podjąć następujące główne zagadnienia badawcze dotyczące:

- **Wpływu miejsca przeszczepu na przeżycie, integrację i migrację KM**
- **Wpływu czasu pomiędzy uszkodzeniem a transplantacją na przeżycie, migrację i integrację KM z tkanką biorcy**
- **Wpływu wzajemnych oddziaływań pomiędzy przeszczepionymi KM a tkanką biorcy**
- **Wpływu mikrośrodowiska na ukierunkowanie różnicowania i właściwości adjuwantowe przeszczepianych KM**
- **Wpływu naturalnej selekcji i zmian fenotypu komórek MSC w czasie hodowli na stopień ich zróżnicowania i właściwości regeneracyjne**

Wpływ miejsca przeszczepu na przeżycie, integrację i migrację KM. Badania habilitantki koncentrowały się głównie na ocenie przeszczepów progenitorów neuralnych wyprowadzonych z krwi pępowinowej transplantowane na tkankę hipokampa w postaci zawiesiny pojedynczych komórek (HUCB-NSC), lub w postaci neurosfer (wielokomórkowych agregatów nie zróżnicowanych NSC), pozyskanych w pożywce wolnej od surowicy *in vitro* (N-HUCB). Uzyskane wyniki wykazały, że zachowanie komórek po transplantacji było silnie zależne od regionu histologicznego, w który zostały podane. KM przeszczepione jako zawiesina pojedynczych komórek lub podane w postaci neurosfer, migrowały z DG w kierunku CA (region bogaty w neurony), wykorzystując naturalne szlaki włókien typowe dla endogennego ruchu neuroblastów. Osiągając region CA, różnicowały się i włączały w istniejącą cytoarchitekturę tkanki. Przeciwnie, komórki transplantowane jako neurosfery do regionu EC pozostawały nie zróżnicowane (spoczynkowe) przez cały okres naszej obserwacji.



WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Zakład Medycyny Regeneracyjnej

Wpływ czasu pomiędzy uszkodzeniem a transplantacją na przeżycie, migrację i integrację KM z tkanką biorcy. Habilitantka wykazała, że MSC posiadają silne działanie neuroprotektoryjne związane głównie z działaniem adjuwantowym, nie wymagającym bezpośredniego kontaktu z uszkodzoną tkanką. Mechanizm neuroprotektoryjny wywołany przez transplantację MSC różni się od opisywanego fizjologicznego mechanizmu neuroprotekcji opartej na oddziaływaniu mikrogleju, który wymaga bezpośredniego kontaktu komórka-komórka z neuronami w niedotlenionej tkance (Neumann i wsp. 2006). Obserwowany efekt terapeutyczny wydaje się nie być warunkowany stopniem zróżnicowania neuronalnego podawanych komórek terapeutycznych. Jednocześnie ponownie udowodniono, że w celu odbudowy sieci neuronalnej niezbędne jest pozyskanie subpopulacji komórek o silnych właściwościach do różnicowania w kierunku neuralnym.

Wpływ wzajemnych oddziaływań pomiędzy przeszczepionymi KM a tkanką biorcy. Habilitantka wykazała, że w celu odbudowy sieci neuronalnej niezbędne jest pozyskanie subpopulacji komórek o silnych właściwościach do różnicowania w kierunku neuralnym. Taki potencjał mogą nabyć również komórki MSC pod wpływem odpowiedniej zmiany środowiska. Podsumowując, habilitantka wykazała, że MSC posiadają silne działanie neuroprotektoryjne związane głównie z działaniem adjuwantowym, nie wymagającym bezpośredniego kontaktu z uszkodzoną tkanką. Mechanizm neuroprotektoryjny wywołany przez transplantację MSC różni się od opisywanego fizjologicznego mechanizmu neuroprotekcji opartej na oddziaływaniu mikrogleju, który wymaga bezpośredniego kontaktu komórka-komórka z neuronami w niedotlenionej tkance.

Wpływ mikrośrodowiska na ukierunkowanie różnicowania i właściwości adjuwantowe przeszczepianych KM. Uzyskane przez habilitantkę wyniki wskazują na istotne różnice w ekspresji kluczowych czynników wpływających na biologię prekursorów neuralnych w różnych regionach OUN. Wykazana lokalna niejednorodność tkanek powinna być brana pod uwagę przy planowaniu terapii komórkowych. Celem badań było również dobranie optymalnego, bioaktywnego szkieletu oraz wpływ na efekt neuroprotektoryjny wywołany przez zasiedlające szkielet MSC izolowane z galarety Whartona (WJ-MS). Stworzenie dla komórek podłoża do proliferacji i różnicowania się oraz zapewnienie bariery dla układu immunologicznego jak

wykazała habilitantka wzmocniło efekt neuroprotektynowy i przeciwzapalny WJ-MSC, co silnie korelowało z lepszym przeżyciem przeszczepu.

Wpływ naturalnej selekcji i zmian fenotypu komórek MSC w czasie hodowli na stopień ich zróżnicowania i właściwości regeneracyjne. Pomimo intensywnie prowadzonych badań nad wykorzystaniem KM w terapiach rekonstrukcyjnych, tylko w niewielu schorzeniach narządowych (i to z wykluczeniem mózgu) udało się udowodnić funkcjonalną integrację przeszczepu z tkankami biorcy oraz udział transplutowanych MSC w odbudowie uszkodzonego narządu. Habilitantka wykazała, że KM mają potencjalne zdolności do odbudowy uszkodzonych sieci neuralnych. Niemniej jednak o ile w środowisku *ex vivo* możemy te oddziaływania obserwować i częściowo kontrolować, o tyle *in vivo* nadal nie dysponuje się takimi możliwościami. Dzieje się tak m.in. ze względu na brak zaawansowanych technik przyżyciowego znakowania i obserwacji komórek podawanych pacjentom przez dłuższy czas po przeszczepie.

Podsumowanie

Podsumowując stwierdzam, że dorobek naukowy doktor nauk medycznych Anny Otylii Sarnowskiej jest nowatorski w skali krajowej i wystarczający do ubiegania się o uzyskanie tytułu naukowego doktora habilitowanego nauk medycznych. Co zasługuje na szczególne podkreślenie habilitantka potrafi skutecznie łączyć rozległą wiedzę z dobrym warsztatem doświadczalnym oraz co zasługuje na szczególne uznanie z praktyka kliniczna. W związku z tym przedkładam wniosek Radzie Naukowej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego, PAN w Warszawie o dopuszczenie doktor nauk medycznych Anny Otylii Sarnowskiej do dalszych etapów przewodu habilitacyjnego.

Z wyrazami szacunku

Prof. dr hab. med. *d. hc* Mariusz Z. Ratajczak

KIEROWNIK
Zakładu Medycyny Regeneracyjnej
Wydziału Lekarskiego
Prof. dr hab. n. med. Mariusz Z. Ratajczak