

Autoreferat

Mirosław Janowski

Zakład Neurobiologii Naprawczej

Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego

Polskiej Akademii Nauk

Warszawa, 2016

1. Imię i Nazwisko: Mirosław Janowski

Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

- I. Lekarz medycyny, I Wydział Lekarski, Warszawski Uniwersytet Medyczny w Warszawie, 2001 r.
- II. Magister Psychologii, Wydział Psychologii, Uniwersytet Warszawski w Warszawie, 2001 r.
- III. Specjalista Neurochirurg, Warszawski Uniwersytet Medyczny w Warszawie, 2009 r.
- IV. Doktor nauk medycznych, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN w Warszawie, 2010 r.

2. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych

- I. 2002 - 2003 Podyplomowy staż kliniczny, Samodzielny Publiczny Centralny Szpital Kliniczny, Warszawski Uniwersytet Medyczny w Warszawie
- II. 2003 - 2009 Klinika Neurochirurgii, Samodzielny Publiczny Centralny Szpital Kliniczny, Warszawski Uniwersytet Medyczny w Warszawie, w wymiarze 1 etatu
- III. 2003 – obecnie Zakład Neurobiologii Naprawczej, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN w Warszawie, w wymiarze ½ etatu.
- IV. 2009 – obecnie Zesół Badawczo Lecznicy Neurochirurgii Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN w Warszawie, w wymiarze ½ etatu.
- V. 2009 - 2011 Klinika Neurochirurgii, szpital Bielański w wymiarze ½ etatu.
- VI. 2011 – obecnie: Zakład Radiologii i Instytut Inżynierii Komórkowej, Uniwersytet Johns Hopkins.

3. Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

- I. Tytuł osiągnięcia naukowego:

Monotematyczny cykl publikacji zatytułowany: **Optymalizacja metody przeszczepiania komórek do ośrodkowego układu nerwowego w modelach zwierzęcych z wykorzystaniem obrazowania wielomodalnego**

Osiągnięcie zostało udokumentowane cyklem 7 prac naukowych, w tym 6 prac Oryginalnych i 1 pracy przeglądowej, opublikowanych w recenzowanych czasopismach, znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports (JCR)* o sumarycznym współczynniku oddziaływania, IF=59,199 punktacji MNiSW =285 i liczbie cytowań=73.

II. Monotematyczny cykl publikacji zawiera następujące publikacje naukowe (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, współczynnik wpływu „impact factor” IF oraz punktacja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego MNiSW):

1. Gorelik M¹, **Janowski M¹**, Robert Rifkin R, Levy M, Lukomska B, Kerr D, Bulte JWM, Walczak P: Non-Invasive Monitoring of Immunosuppressive Drug Efficacy to Prevent Rejection of Intracerebral Glial Precursor Allografts. *Cell Transpl* 2012;21(10):2149-52
IF=4.422 pkt MNiSW=40 Cytowania: 5 ¹ – równorzędni autorzy
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):253-62
IF=3.127 pkt MNiSW=25 Cytowania: 6
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. *Nature Methods* 2012;9:856-858
IF=23.565 pkt MNiSW=50 Cytowania: 6
4. **Janowski M**, Lyczek A, Engels C, Xu J, Lukomska B, Bulte J, Walczak P: Cell size and Velocity of Injection are Major Determinants of the Safety of Intracarotid Stem Cell Transplantation. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 2013 Jun 33(6):921-927
IF=5.339 pkt MNiSW=40 Cytowania: 28
5. **Janowski M**, Walczak P, Pearl M: Predicting and optimizing the territory of blood-brain barrier opening by super-selective intra-arterial cerebral infusion under dynamic susceptibility contrast MRI guidance. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 2016 Mar;36(3):569-75
IF=4.929 pkt MNiSW=40 Cytowania: 0
6. Walczak P, Wojtkiewicz J, Nowakowski A, Chehade M, Habich A, Holak P, Xu J, Adamiak Z, Pearl M, Gailloud P, Lukomska B, Maksymowicz W, Bulte JWM, **Janowski M**: Real-time MRI for predicting and subsequent validation of intra-arterial stem cell delivery to the central nervous system. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 2016 DOI: [10.1177/0271678X16665853](https://doi.org/10.1177/0271678X16665853)
IF=4.929 pkt MNiSW= 40 Cytowania: 0
7. **Janowski M**, Bulte JW, Walczak P: Personalized nanomedicine advancements for stem cell tracking. *Adv Drug Deliv Rev* 2012 64(13):1488-1507

- III. Omówienie celu naukowego w/w prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Omówienie celu naukowego osiągnięcia naukowego stanowiącego przedmiot rozprawy habilitacyjnej

Starzenie się społeczeństw i siedzący tryb życia przyczyniają się do rozwoju chorób cywilizacyjnych. Choroby neurologiczne odgrywają szczególną rolę ze względu na znaczący poziom niepełnosprawności i częstą konieczność stałej opieki ze strony osób trzecich. W związku z tym problem dotyczy nie tylko cierpienia ludzi chorych, ale stanowi także bardzo duże obciążenie dla społeczeństwa, aby zapewnić tak dużej liczbie chorych odpowiedni poziom opieki. Stosowane obecnie metody leczenia nie są wystarczająco skuteczne, a liczne próby kliniczne z zastosowaniem nowych leków nie przyniosły jak dotąd oczekiwanych rezultatów. Może to być spowodowane kompleksowością procesów patologicznych towarzyszących schorzeniom ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Cechą charakterystyczną chorób neurologicznych jest obumieranie neuronów, co przy bardzo ograniczonych możliwościach ich regeneracji u dorosłych osobników stanowi bardzo duże wyzwanie dla klinicystów. Dlatego też, coraz większe zainteresowanie w leczeniu tych chorób budzi perspektywa terapii komórkowej.

Pierwotnie terapia komórkowa uszkodzonych struktur OUN opierała się na koncepcji zastąpienia obumarłych komórek nowymi egzogennymi komórkami wprowadzonymi do organizmu biorcy na drodze transplantacji. W badaniach eksperymentalnych wykazano, że przeszczep komórek przyczynia się do złagodzenia objawów w zwierzęcym modelu choroby Parkinsona, oraz u części pacjentów cierpiących na tę chorobę (Lindvall, Brundin et al. 1990). Inni autorzy wykazali, że pozytywny efekt terapeutyczny przeszczepu komórek może utrzymywać się nawet przez 10 lat po transplantacji), a część z tych pacjentów nie wymaga wspomaganie farmakologicznego przez prawie dwie dekady od zabiegu (Kefalopoulou, Politis et al. 2014), co jest doskonałym przykładem na to, że terapia komórkowa może być skuteczną metodą leczenia. Należy jednak podkreślić, że dwie niezależne randomizowane próby kliniczne przeprowadzone w dużych grupach pacjentów nie wykazały statystycznie istotnego pozytywnego efektu (Freed, Greene et al. 2001, Olanow, Freeman et al. 2001), co prawdopodobnie wynika z różnic odpowiedzi na terapię u poszczególnych pacjentów. Zachodzi więc konieczność poznania przyczyn tak dużej zmienności, która może mieć swoje źródło zarówno w sposobie przygotowania komórek do przeszczepu, metodzie i miejscu transplantacji jak i zachowaniu wszczepionych komórek oraz odpowiedzi biorcy na komórki dawcy. Początkowo uważano, że mózg jest miejscem uprzywilejowanym immunologicznie niewymagającym stosowania immunosupresji przy przeszczepach allogenicznych. Jednak ostatnio opisane przypadki pacjentów po transplantacji komórek niezgodnych antygenowo, którzy zmarli z innych przyczyn wykazały obecność procesu odrzucania przeszczepów, co jest wskazaniem do tego aby zwrócić szczególną uwagę na ten aspekt transplantacji (Capetian, Knoth et al. 2009).

Pozytywne efekty transplantacji w leczeniu choroby Parkinsona spowodowały lawinę badań nad zastosowaniem egzogennych komórek także w innych chorobach neurologicznych. W licznych meta-analizach badań przedklinicznych wykazano dużą skuteczność przeszczepów komórkowych (Janowski, Walczak et al. 2010, Lees, Sena et al. 2012, Vu, Xie et al. 2014, Hu, Liu et al. 2015, Peng, Sun et al. 2015, Riecke, Johns et al. 2015). Dokładniejsza analiza metodą meta-regresji wykazała jednak, że wprowadzone do organizmu komórki nie zastępują obumarłych, ale wykazują szereg innych pozytywnych działań, w tym najbardziej znaczącym jest zahamowanie apoptozy (Janowski, Walczak et al. 2010). Ostatnie opracowanie na temat metod działania przeszczepów komórkowych wskazuje, że ich pośredni wpływ poprzez wydzielanie różnych czynników oraz inne formy wspomagania komórek endogennych są głównymi mechanizmami terapeutycznymi (Janowski, Wagner et al. 2015). Niestety jak dotychczas, wyżej wymienione badania należy traktować jedynie jako dowód, że terapia komórkowa może być skuteczna, ale wciąż nie jest wystarczająco powtarzalna, aby mogła zostać włączona do rutynowych algorytmów terapeutycznych.

Przez lata najlepsze efekty terapeutyczne osiągnęto przeszczepiając komórki pochodzenia płodowego. Źródło to jednak nie było jednorodne pod względem materiału komórkowego; zaobserwowano duże różnice jakościowe pomiędzy poszczególnymi płodami. Ponadto konieczność wykonania aborcji w celu pozyskania materiału do transplantacji obarczona była problemami natury etycznej i prawnej. Zastosowanie somatycznych komórek macierzystych i progenitorowych pochodzących od dorosłych dawców pozwala na pominięcie problemów etycznych, ale kwestia różnic jakości materiału pomiędzy poszczególnymi dawcami wciąż pozostaje nierozwiązana. W pewnych przypadkach pobranie materiału komórkowego (np. nerwowe komórki macierzyste) wiąże się z wykonaniem zabiegu neurochirurgicznego, co stanowi dodatkową przeszkodę w rozpowszechnieniu tych metod leczenia (Czyż, Tabakow i wsp. 2015). Nabycie umiejętności hodowli ludzkich embrionalnych komórek macierzystych na etapie ich pluripotencjalności pozwoliło na dowolny ich rozpleni i potencjalne wyeliminowanie problemu ich dostępności (Thomson, Itskovitz-Eldor et al. 1998). Kolejnym przełomem była indukcja stanu pluripotencjalności w komórkach somatycznych, co pozwoliło na izolację komórek od pacjentów, u których planowano przeszczep (Takahashi and Yamanaka 2006, Takahashi, Tanabe et al. 2007). Dostępność materiału autologicznego eliminuje kwestie etyczne i konieczność stosowania leków immunosupresyjnych (Zhao, Zhang et al. 2011). W ostatnich latach opracowano protokoły różnicowania komórek pluripotencjalnych pochodzenia zarówno embrionalnego jak i indukowanych i wykazano w modelach zwierzęcych, że skuteczność terapeutyczna takich komórek jest wysoka i nie odbiega od wyników, jakie uzyskano poprzednio z użyciem komórek płodowych (Steinbeck, Choi et al. 2015) (Pereira, Pfisterer et al. 2014, Hallett, Deleidi et al. 2015). Obecnie trwają intensywne prace nad opracowaniem hodowli tych komórek w warunkach pozwalających na zastosowanie kliniczne (GMP-compliant) oraz nad standaryzacją materiału komórkowego.

Problemem badawczym wciąż czekającym na rozwiązanie jest sposób i miejsce podania komórek tak, aby dotarły do miejsca przeznaczenia, w kontekście możliwości osiągnięcia przez nie efektu terapeutycznego. W chwili obecnej w przypadku schorzeń OUN najczęściej wykorzystuje się bezpośrednie transplantacje komórek do mózgu i rdzenia lub podania dożylnie.

Te pierwsze pozwalają na skuteczne umieszczenie komórek w pożądanym miejscu, ale wymagają otwarcia czaszki lub wykonania bardzo skomplikowanej operacji kręgosłupowej (Tabakow, Jarmundowicz et al. 2013, Tabakow, Raisman et al. 2014), co może być czynnikiem ograniczającym ich stosowanie. Natomiast podania dożylna, chociaż nieinwazyjne i bardzo łatwe do wykonania, wykazują brak skuteczności w umiejscowieniu się przeszczepionych komórek w określonych miejscach układu nerwowego. Wydaje się, że konieczne jest znalezienie konsensusu i rozwoju technik, które pozwolą na dostarczenie komórek do mózgu i rdzenia kręgowego w sposób małoinwazyjny. Takim sposobem może być droga dotętnicza i podpajęczna, jednak podanie komórek do płynów ustrojowych wymaga zaawansowanych metod obrazowania, aby móc skierować przeszczepiane komórki we właściwe miejsce. Ponadto uważa się, że bardziej globalne drogi podania (np. dotętnicza) mogłyby się przyczynić do bardziej równomiernego rozmieszczenia przeszczepianych komórek w określonych strukturach OUN.

a) Omówienie osiągniętych wyników

Zastosowanie obrazowania zwierząt w celu optymalizacji metod ochrony przeszczepu przed odrzuceniem

Pomimo dużych nakładów pracy i kosztów na rozwój autologicznych przeszczepów komórkowych zarówno w badaniach eksperymentalnych i klinicznych, allotransplantacje odgrywają dominującą rolę. Wprowadzenie komórek od dawcy niezgodnego antygenowo sprawia iż przeszczep narażony jest na atak ze strony układu immunologicznego gospodarza. W związku z tym konieczne wydaje się zastosowanie immunosupresji. Dotychczas standardową metodą oceny skuteczności leków immunosupresyjnych w przeszczepach domózgowych była analiza przeprowadzana *postmortem* w różnych odstępach czasu po transplantacji. Taka ocena wiązała się z dużymi kosztami i nie pozwalała na precyzyjne ustalenie przebiegu procesu odrzucania przeszczepu. W związku z tym podjęto badania zmierzające do przyżyciowej oceny dynamiki odrzucania przeszczepów, z udziałem bioluminescencji, których wyniki zostały przedstawione w **pracy nr 1**.

Bioluminescencja jest zjawiskiem, polegającym na emisji fotonów w reakcji oksydacji substratu, katalizowanej przez specjalny enzym. Dobrze znanym przykładem bioluminescencji są świetliki. W moich doświadczeniach odpowiedzialny za tę reakcję gen lucyferazy, został wprowadzony do glejowych komórek progenitorowych myszy. W następnym etapie potwierdzono stabilność tej transdukcji przez ponad 20 pasażów komórkowych, a także wysoką czułość reakcji pozwalającą na detekcję *in vitro* poszczególnych komórek. Do detekcji bioluminescencji użyto specjalnego urządzenia z chłodzoną kamerą wysokiej czułości Xenogen IVIS 200 (Caliper LifeScences). Wykazano zależność liniową liczby komórek oraz emitowanych przez nie fotonów, co pozwala na relatywną ocenę liczbową komórek. Zastosowanie bioluminescencji w badaniach *in vivo* pozwala na przyżyciową ocenę żywotności przeszczepu poprzez ocenę przeszczepionych komórek w sekwencji czasowej. Poza tym zwierzęta poddawane transplantacji komórek znakowanych lucyferazą stanowią jednocześnie kontrolę,

co stwarza możliwość użycia schematu badań wielokrotnie powtarzanych i poprawia precyzję oszacowania statystycznego.

Kluczowym elementem badań była ocena przydatności bioluminescencji do śledzenia przeżycia przeszczepu progenitorów glejowych u myszy immunokompetentnych BALB/c poddanych, bądź nie, immunosupresji. Badano dwa schematy postępowania immunosupresyjnego: terapię przy użyciu cyklosporyny A oraz FK506 i Rapamycyny. Wyniki badań porównano z przeżyciem przeszczepu tych samych komórek u myszy z upośledzoną odpowiedzią immunologiczną rag2^{-/-} (pozbawionych genu rekombinazy, która jest odpowiedzialna za odporność nabytą). Obrazowanie wykonywano u zwierząt dwa razy w tygodniu poczynając od dnia pierwszego po przeszczepie. Wyniki badań wykazały przeżycie przeszczepionych komórek u wszystkich myszy rag2^{-/-} podczas 24-dniowego okresu obserwacji. Co ciekawe stwierdzono stopniowy wzrost bioluminescencji najpewniej spowodowany proliferacją przeszczepionych komórek, co wskazuje, że komórki dawcy mają zdolność przeżycia w organizmie biorcy i zachowują swoje funkcje, jeśli nie są narażone na atak układu immunologicznego gospodarza. U zwierząt immunokompetentnych odnotowano wzrost poziomu bioluminescencji w początkowym okresie po przeszczepie (do 8 dni), co może świadczyć o tym, iż w sensie metabolicznym komórki miały właściwe warunki do wzrostu. Jednak w ciągu 3 tygodni u 70 % tych myszy doszło do odrzucenia komórek dawcy, podczas gdy u pozostałych 30 % zwierząt dynamika wzrostu wśród przeszczepionych komórek nie różniła się od tej stwierdzanej u zwierząt rag2^{-/-}. U tych zwierząt, u których zaobserwowano odrzucenie przeszczepu, proces ten odbywał się bardzo szybko i następował w ciągu 2-5 dni od jego zapoczątkowania, ale nigdy wcześniej niż 8 dni po przeszczepie. U myszy poddanych immunosupresji z użyciem CyA obserwowano wzrost liczby zwierząt, u których zanotowano przeżycie przeszczepu (44.6 %). Zastosowanie dwuskładnikowej immunosupresji (FK506+Rapamycyna) skutkowało dalszym zwiększeniem liczby zwierząt z akceptacją przeszczepu do 77.8 %. Wszystkie przeszczepy, które nie uległy odrzuceniu w czasie 8-16 dni, przeżyły kolejne 8 dni. Po 24 dniach od wykonanej transplantacji wszystkie zwierzęta eksperymentalne zostały poddane głębokiej narkozie, a ich mózgi pobrane i poddane weryfikacji histologicznej. Badanie pośmiertne potwierdziło obecność przeszczepionych komórek u wszystkich zwierząt, u których była widoczna bioluminescencja i ich brak u tych zwierząt, które jej nie wykazywały. Potwierdza to wiarygodność użycia bioluminescencji do detekcji komórek ekspresujących lucyferazę. Badanie histologiczne przyniosło dalsze interesujące informacje. Nie stwierdzono nacieku przeszczepu przez komórki immunologiczne u zwierząt rag2^{-/-}, podczas gdy u zwierząt otrzymujących immunosupresję obserwowano znaczące nacieki komórek zapalnych, które jednak nie powodowały zmniejszenia wielkości/żywołności przeszczepu. Wydaje się jednak, że obecność komórek immunologicznie czynnych w okolicy przeżywającego przeszczepu może ograniczać jego funkcjonalność. Innymi słowy duże różnice pomiędzy efektami terapeutycznymi u poszczególnych pacjentów mogą wynikać z różnic w odpowiedzi immunologicznej biorcy na przeszczepione komórki dawcy. W naszych badaniach nie określiliśmy przyczyn różnic w odrzucaniu przeszczepów wewnątrz tych samych grup eksperymentalnych. Wysunięto jednak hipotezę, że przyczyną tych różnic może być miejsce przeszczepu. Spoidło wielkie, do którego przeszczepiane były egzogenne

komórki w tej pracy stanowi anatomicznie bardzo małą strukturę w płaszczyźnie grzbietowo-brzusznej. Wprowadzenie igły transplantacyjnej mogło spowodować różnice u poszczególnych zwierząt, wynikające z tego czy przeszczep jest bardziej otoczony przez istotę białą, czy istotę szarą. Takiej retrospektywnej analizy nie można było przeprowadzić w oparciu o pobrane mózgi myszy, ze względu na brak pewności, co do dokładnej lokalizacji przeszczepów, które zostały odrzucone.

Dotychczasowe wyniki moich badań przedstawione w pracy nr 1 dały asumpt do przeprowadzenia kolejnej serii badań, których przedmiot zawarty jest w **pracy nr 2**. W badaniach tych starannie wyselekcjonowano dwa miejsca podania komórek znacząco różniące się mikrośrodowiskiem. Jako region mózgu specyficzny dla istoty białej wybrano szczytce mniejsze, które są największym obszarem istoty białej u myszy, co w związku z tym pozwala na umieszczenie przeszczepu selektywnie w istocie białej. Jako region mózgu specyficzny dla istoty szarej wybrano prążkowie, pomimo, że przebiegają przez nie także pasma istoty białej. Nie zdecydowano się na podanie komórek do kory mózgu ze względu na jej powierzchowne położenie i ryzyko wstecznego wypływu komórek poza mózg. U zwierząt eksperymentalnych nie stosowano immunosupresji. Przedmiotem badań były mysie progenitorowe komórki glejowe pochodzenia płodowego, te same, które były stosowane w poprzednich eksperymentach i opisane w publikacji nr 1. W pierwszym etapie komórki zostały wyznakowane nanocząstkami tlenku żelaza w celu ich późniejszej identyfikacji w MRI, a następnie przeszczepione w wybrane miejsca mózgu. Prawidłową lokalizację komórek dawcy oceniano przy pomocy skanera MRI, dodatkowo potwierdzając to późniejszymi badaniami histologicznymi. Interesującym faktem było to, że przeszczep wykonany do istoty białej cechował się typowym położeniem komórek wzdłuż śladu igły, tworząc kształt walca. Natomiast większość komórek podanych do prążkowie uległa niewielkiemu cofnięciu i usadowiła się pomiędzy prążkowie i ciałem modzelowatym przyjmując półksiężycowaty kształt, uwarunkowany topografią tej okolicy. Obserwowano permanentne przeżycie przeszczepów u myszy *rag2^{-/-}* w obu lokalizacjach. Natomiast przeżycie komórek dawcy u immunokompetentnych biorców było dramatycznie różne w zależności od miejsca podania. Wszystkie przeszczepy umieszczone w istocie białej uległy odrzuceniu, podczas gdy wszystkie przeszczepy do prążkowie przeżyły 16 dni. Podobnie jak wykazano w publikacji nr 1, komórki dawcy, które przeżywają pierwsze 16 dni nie ulegały odrzuceniu w ciągu kolejnych 8 dni. Szukając przyczyny różnicy w przeżyciu przeszczepów uwarunkowanych miejscem ich podania zbadano *in vivo* status bariery krew-mózg w obu lokalizacjach w piątym dniu po przeszczepie używając znacznika widzialnego w dalekiej podczerwieni (długość fali optycznej charakteryzująca się najlepszą przenikalnością przez żywe tkanki) oraz specjalnego aparatu służącego tej metodzie detekcji (Pearl Imager, LICOR). Choć stwierdzono rozszczelnienie bariery krew-mózg w obu lokalizacjach, nie znaleziono różnic pomiędzy nimi. Badanie *post mortem* uwidocznilo obecność przeszczepionych komórek u wszystkich myszy wykazujących bioluminescencję, natomiast ich brak u zwierząt, u których nie stwierdzono sygnału świetlnego. Dokładna analiza immunohistochemiczna wykazała obecność nacieku komórek immunologicznie czynnych głównie w przyśrodkowej części przeszczepu, w okolicy śladu po igle, natomiast komórki dawcy „wtłoczone” pomiędzy prążkowie i ciało modzelowate były

wolne od nacieku komórkowego gospodarza. Ponieważ po 16 dniach od przeszczepu do istoty białej nie stwierdzono żywych komórek dawcy bezpośrednio porównanie procesu odrzucania nie było możliwe. W związku z tym wykonano identyczne przeszczepy w tych samych grupach eksperymentalnych, ale tym razem zwierzęta uśmiercono we wczesnym okresie po przeszczepie, kiedy obie grupy wykazywały jeszcze ten sam poziom bioluminescencji. Zarówno u myszy otrzymujących przeszczep do istoty białej jak i tych, którym przeszczepiano komórki do prążkowiec obserwowano nacieki komórek zapalnych. Ich liczba, w tym komórek CD11b- i CD8- pozytywnych była dużo większa w przypadku przeszczepów do istoty białej. Komórki CD4-pozytywne występowały bardzo rzadko i nie stwierdzono różnic w ich liczbie pomiędzy zwierzętami ze zróżnicowanym miejscem wykonania przeszczepów. Bardzo interesującą obserwacją wydaje się to, iż przeszczep zlokalizowany w istocie białej był otoczony mankietem aktywowanych komórek mikrogleju. Obecność tych komórek w tak dużej liczbie mogło negatywnie wpływać na przeżycie komórek dawcy. Natomiast w okolicy przeszczepu do prążkowiec nie obserwowano nagromadzenia aktywowanych komórek mikrogleju. Komórki dawcy, „wciśnięte” pomiędzy prążkowiec i ciało modzelowate w ogóle nie wykazywały zmian będących następstwem działania układu immunologicznego biorcy, a ze względu na swój kształt i charakter to miejsce zostało nazwane przez nas „kieszenią”. Być może także w pierwszym przypadku umieszczanie komórek w szczypcach mniejszych spowodowało dodatkowo uraz mechaniczny mózgu „rozdieranego” przeszczepem, który zwiększając lokalne ciśnienie i powodując bezpośredni ucisk tkankowy mógł wywołać reakcję gospodarza, znacznie bardziej agresywną wobec przeszczepu. Z kolei wniknięcie komórek dawcy do „wirtualnej” przestrzeni pomiędzy prążkowiec i spoidłem wielkim ograniczyło mechaniczny uraz mózgu i nie tworzyło „otwartych” wrót do ataku przez komórki zapalne. Innymi słowy komórki „ukryte” w kieszeni nie były atakowane przez układ immunologiczny biorcy. Jednak takie „ukrycie” komórek może utrudniać ich funkcjonowanie, co będzie stanowić podstawę do dalszych badań. Podsumowując, w tej pracy udało się wyjaśnić problem przeżywania przeszczepu u niektórych biorców i braku przeżycia u innych obserwowane w pracy nr 1. Jednak „zamknięcie” allogenicznych komórek w kieszeni nie jest optymalnym rozwiązaniem, wobec czego konieczne jest dalsze poszukiwanie skutecznej metody na zapobieganie odrzucania przeszczepu. Praca ta zwraca także uwagę na to, iż uraz mechaniczny po domózgowej transplantacji komórek jest niepożądanym działaniem stąd wydaje się, że należy szukać innych metod, które minimalizując uraz mechaniczny są w stanie zapewnić szeroką dystrybucję komórek w ośrodkowym układzie nerwowym.

Wyżej wymienione prace pokazały, że ochrona przeszczepu allogenicznego przed odrzuceniem ze strony gospodarza jest bardzo dużym wyzwaniem. Próby przedłużenia przeżycia egzogennych komórek pochodzących od niespokrewnionych dawców są przedmiotem badań wielu zespołów naukowych na świecie. Opublikowana w *Nature Methods* w roku 2009 w praca zespołu Kelly z Cardiff University, w której autorzy donosili, że znaleźli sposób na uzyskanie tolerancji biorcy nawet na ksenoprzeszczep poprzez zastosowanie desensytyzacji u osesków myszy (Kelly, Precious et al. 2009), stwarzała możliwość porównań różnych typów ludzkich komórek zanim zostaną one zastosowane w badaniach klinicznych. Procedura ta polega na wprowadzeniu komórek dawcy do przyszłego biorcy, wykorzystując

zwierzęta tuż po urodzeniu, dzięki której układ immunologiczny dorosłego osobnika nie rozpoznaje antygenów zawartych w przeszczepionych komórkach, jako obcych. To podejście jest bardzo dobrze znane w dziedzinie transplantacji narządów, ale skuteczne jedynie w odniesieniu do allo- a nie ksenoprzeszczepów. Poza tym warunkiem wystąpienia takiej desensytyzacji jest mikrochimeryzm, czyli trwała obecność podanych komórek dawcy w organizmie biorcy. Wyniki badań Kelly i wsp. zachęciły nas do podjęcia próby wykorzystania metody desensytyzacji w naszych modelach doświadczalnych stosując przeszczep komórek zarówno allogenicznych jak i ksenogenicznych. Dodatkowo do metod immunohistochemicznych wykorzystanych przez zespół Kelly zastosowaliśmy bioluminescencję w celu oceny dynamiki żywotności komórek przeszczepianych zarówno w celu desensytyzacji jak i w celach potencjalnie terapeutycznych. Badania były przedmiotem opublikowanej **pracy nr 3**. Do eksperymentów zostały użyte progenitorowe komórki glejowe pochodzenia ludzkiego wykazujące obecność lucyferazy. Oseki myszy zostały poddane desensytyzacji w sposób poprzednio opisany przez Kelly i wsp. Metodą bioluminescencji potwierdziliśmy skuteczne umieszczenie ludzkich progenitorów glejowej w jamie otrzewnowej zwierząt. Niestety obrazowanie bioluminescencyjne wykonane w kolejnych dniach po transplantacji wykazało szybki zanik sygnału (w ciągu 6 dni), co wskazuje na odrzucenie wszczepionych komórek przez gospodarza i w konsekwencji brak wystąpienia mikrochimeryzmu. W kolejnym etapie badań te same myszy poddane desensytyzacji, po osiągnięciu przez nie dojrzałości, otrzymały przeszczep progenitorów glejowych do mózgu. Kontrolę stanowiły zwierzęta niepoddane procedurze desensytyzacji. Podobnie jak w doświadczeniach Kelly i wsp. biorcy transplantów nie otrzymywali żadnej immunosupresji. Nasze badania przeprowadzone metodą bioluminescencyjną wykazały stosunkowo szybki zanik sygnału w obu grupach zwierząt (w ciągu 10 dni). Analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic pomiędzy grupą eksperymentalną (po desensytyzacji) i grupa kontrolną (bez wcześniejszego uczulenia). Tak więc nie tylko nie uzyskano całkowitej tolerancji u myszy, którym podano komórki dawcy tuż po urodzeniu na późniejszy ich przeszczep w życiu dorosłym, ale także nie obserwowano wydłużenia przeżycia przeszczepów podanych do desensytyzowanych zwierząt. Badania pośmiertne potwierdziły brak komórek dawcy, a wielkość nacieku komórek immunologicznie czynnych nie różniła się pomiędzy dwoma grupami zwierząt. Podobnie jak w poprzednich naszych pracach z udziałem przeszczepów mysich komórek glejowych potwierdzono przeżycie ludzkich progenitorów glejowych u myszy rag2^{-/-} (z genetycznie osłabioną odpornością). Innymi słowy powyższy eksperyment nie potwierdził skuteczności desensytyzacji dokonanej u osesków późniejszych biorców przeszczepu w zapobieganiu odrzucania ksenoprzeszczepów ludzkich glejowych komórek progenitorowych u myszy w następstwie desensytyzacji gospodarza. W celu wykluczenia przypadkowo osiągniętego wyniku przeprowadzono kolejne eksperymenty używając do tego celu innych komórek: ludzkich neuralnych komórek macierzystych, oraz innego gatunku zwierząt, szczurów. Także w tym przypadku nie zaobserwowano ochronnego działania procesu desensytyzacji. Zdolność ludzkich neuralnych komórek macierzystych do przeżycia w mózgu biorcy została ponownie potwierdzona przeszczepem do myszy rag2^{-/-}. Podsumowując wykazaliśmy, że metoda opisana przez Kelly i wsp nie jest uniwersalna. Być może odnosi się tylko do komórek badanych przez tę grupę. Ponadto optymistyczne wyniki

badania autorów nad przedłużeniem przeżycia przeszczepów w wyniku desensytyzacji biorców były uzyskane jedynie przy użyciu immunohistochemii, co niesie ze sobą ryzyko pomyłki związanej z niespecyficznością barwień. Zastosowanie przez nas techniki bioluminescencji było bardzo pomocne w celu osiągnięcia przekonujących wyników, co zostało docenione przez redakcję *Nature Methods*, gdzie nasze wyniki badań zostały opublikowane w roku 2012. Brak ochronnego efektu desensytyzacji przeprowadzonej u osesków gryzoni został następnie potwierdzony także przez wielośrodkowe badania autorów amerykańskich. W pracy, która ukazała się w *Experimental Neurology*, nasze wyniki badań są cytowane i szeroko komentowane (Mattis, Wakeman et al. 2014).

Poszukiwanie nowych dróg dostarczenia komórek do OUN przy wspomaganii obrazowania komórkowego

Przeszczepy komórek bezpośrednio do mózgu są wciąż podstawową drogą transplantacji w celu leczenia chorób neurologicznych. Jednak ta droga podania powoduje dodatkowy uraz mózgu spowodowany nie tylko nakłuciem igłą, ale mechanicznym uszkodzeniem tkanki wywołanym obecnością przeszczepu, co prowadzi do rozerwania okolicznej struktury mózgu. Ucisk wprowadzonych komórek na tkankę nerwową może być dodatkowym elementem wywołującym stan zapalny. Tak, więc istnieje potrzeba opracowania innych, mniej traumatycznych sposobów przeszczepiania komórek do OUN. Infuzja dotętnicza wydaje się szczególnie interesująca, gdyż umożliwia ich dostarczenie do poszczególnych tętnic mózgowych, a co za tym idzie bezpośrednio do pożądanego obszaru mózgu. Pozwala to na lepsze wykorzystanie komórek (w przypadku wstrzyknięć dożylnych komórki egzogenne są wychwytywane przez płuca i wątrobę) i potencjalnie chroni je przed wystąpieniem działań niepożądanych, związanych z ich gromadzeniem się w innych narządach. Jednak podanie dotętnicze ma swoje wyzwania związane przede wszystkim ze sprawnym pokonaniem bariery krew-mózg podczas przejścia komórek przez naczynia mózgowie. Komórkami, które posiadają zdolność przekraczania tej bariery są aktywowane leukocyty, napływające do mózgu podczas procesów zapalnych, zlokalizowanych w obrębie ośrodkowego układu nerwowego. Istotną rolę w procesie migracji odgrywają integryny obecne na powierzchni krwinek białych. Grupa dr Walczaka z JHU wykazała, że możliwa jest modyfikacja glejowych komórek progenitorowych w celu ekspresji tych integryn oraz, że procedura ta umożliwia zwiększoną adhezję zmodyfikowanych genetycznie komórek do naczyń mózgowych po przeszczepie w modelu eksperymentalnego procesu zapalnego (Gorelik, Orukari et al. 2012). Te eksperymenty były wykonywane w trybie ostrym, co oznacza, że zwierzęta były uśmiercane bezpośrednio po podaniu komórek. W kolejnych eksperymentach zwierzętom pozwolono, na dłuższe przeżycie. Jednak w badaniach obrazowych wykonanych po 24 godzinach od transplantacji stwierdzono niewielkie obszary hiperintensywne w czasie T2 w badaniu MRI, które mogą odpowiadać mikro-udarom. Na problem wystąpienia mikro-udarów po dotętnicznym podaniu komórek już poprzednio zwrócono uwagę i zastąpienie cewnika mikro-igłą połączoną ze strzykawką przyniosło pozytywne efekty (Chua, Pendharkar et al. 2011), ale taka modyfikacja techniki uniemożliwiła wykonywanie transplantacji komórek wewnątrz skanera MRI i obserwowanie całej procedury w czasie rzeczywistym. W związku z tym podjąłem badania mające na celu

opracowanie bezpiecznego sposobu dotętniczego podania komórek przez mikro-cewnik (**praca nr 4**), co w perspektywie pozwoliłoby na możliwość sterowania procesem dotętnicznej infuzji przy użyciu MRI. Szybkość infuzji dotętnicznej komórek dotychczas nie była badana, a w pojedynczych publikacjach stosowano różne szybkości, bez podawania racjonalności wyboru. W przeprowadzonych przez mnie eksperymentach początkowo dostosowałem prędkość podania ludzkich komórek do tętnicy szyjnej wewnętrznej u szczura do prędkości przepływu krwi w tej tętnicy (3 ml/min). Zastosowana prędkość infuzji spowodowała wystąpienie licznych mikro-udarów (u 11 z 15 zwierząt), które były zlokalizowane głównie w okolicach spoidła wielkiego. Pierwsza hipoteza dotyczyła niekorzystnego wpływu układu immunologicznego i możliwości tworzenia mikro-zatorów, spowodowanych reakcją gospodarza na przeszczep ksenogeniczny. W związku z tym w następnym etapie stosując dokładnie te same warunki transplantacji wykorzystałem mniej immunogenne mysie glejowe komórki progenitorowe, ale nie zmniejszyło to częstości występowania powikłań (mikro-udary stwierdzono u 6 z 8 zwierząt), wobec czego odrzucono tę hipotezę. Następną badaną hipotezą dotyczyła ryzyka wystąpienia zaburzeń hemodynamicznych na skutek zamknięcia tożsamej tętnicy szyjnej wewnętrznej w trakcie procedury mikrochirurgicznej. W związku z tym przesunięto w czasie podanie komórek, które przeszczepiono 24 godz. po zamknięciu odpowiednich tętnic, ale ta manipulacja także nie przyniosła spodziewanego rezultatu (u 10 z 15 zwierząt nadal stwierdzono mikro-udary). W kolejnych badaniach przeprowadzono skomplikowaną technicznie procedurę odtworzenia drożności tętnicy szyjnej wewnętrznej po podaniu komórek, ale to podejście także nie przyniosło sukcesu. Skoro powyżej wymienione zmiany warunków eksperymentalnych nie miały żadnego wpływu na częstość występowania powikłań wysunięto hipotezę, że obserwowane mikro-udary nie są związane z komórkami, ale raczej z samą procedurą infuzji. Przedmiotem kolejnych eksperymentów była infuzja samego buforu fosforanowego, stosowanego uprzednio, jako nośnik dla zawiesiny komórek, a pomiar mózgowego przepływu krwi oceniano przy użyciu Dopplera laserowego. Zaskakującym było to, że sama procedura infuzji buforu spowodowała zmniejszenie przepływu. Ponieważ Doppler laserowy mierzy przede wszystkim prędkość erytrocytów, to zanotowany wynik może być efektem „wyparcia” czerwonych krwinek przez pompowany z dużą szybkością bufor fosforanowy. Co więcej okazało się, że nawet infuzja płynu bez komórek powoduje równie częste występowanie mikro-udarów (u 4 z 6 zwierząt). Na podstawie powyższych danych została wysunięta hipoteza, że wstrzykiwany pod dużym ciśnieniem płyn, bez względu na obecność w nim lub nie komórek, prowadzi do występowania mikro-udarów zawsze zlokalizowanych w okolicy spoidła wielkiego – ta okolica stanowi tzw. obszar ostatniej łąki, znajdujący się pomiędzy dwoma dużymi źródłami krwi: naczyniami korowymi i naczyniami głębokimi (perforatorami). W związku z tym zdecydowano się zmniejszyć szybkość infuzji płynu do 1 ml/min, co ograniczyło wartości spadku przepływu krwi w badaniu badane przy pomocy Dopplera laserowego oraz zmniejszyło częstość występowania mikro-udarów (u 2 z 6 zwierząt). W kolejnych eksperymentach zwolniono prędkość iniekcji buforu do 0.2 ml/min, co nie tylko nie spowodowało obniżenie szybkości przepływu w badaniu Dopplerem laserowym, ale wyeliminowało całkowicie problem wystąpienia mikro-udarów. Tę prędkość przepływu zastosowano do infuzji zarówno mysich jak i ludzkich glejowych komórek progenitorowych. Tu również nie zaobserwowano spadku

przepływu w badaniu Dopplerem laserowym. W ten sposób opracowano bezpieczny sposób podawania glejowych komórek progenitorowych. Następnie podjęto badania w celu ustalenia, czy te warunki eksperymentalne są uniwersalne, czy specyficzne tylko dla glejowych komórek progenitorowych, w związku z tym podjęto próby przeszczepiania mezenchymalnych komórek macierzystych. Niestety, iniekcja tych komórek spowodowała zarówno spadek szybkości mózgowego przepływu krwi jak i pojawienie się mikro-udarów. Bezpośrednie porównanie glejowych komórek progenitorowych oraz ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych (hMSCs) wykazało przede wszystkim bardzo duże różnice w wielkości tych komórek. Te pierwsze miały średnicę 13-15 mikrometrów, co stanowi wartość zbliżoną do wielkości leukocytów, podczas gdy średnica hMSCs wahała się w granicach 25 mikrometrów. Wydaje się, że duża wielkość hMSCs podawanych dotętniczo szczerom może sprzyjać biernemu zatrzymywaniu się tych komórek w naczyniach włosowatych i ich częściowemu zatykaniu. Aby potencjalnie zwiększyć ciśnienie w naczyniach mózgowych powrócono do metody bez zatrzymywania przepływu krwi w tożsamej tętnicy szyjnej, ale to nie przyniosło pozytywnych efektów. Żeby sprawdzić czy przypadkiem zbyt duża liczba przeszczepianych komórek nie przekracza możliwości ich przyjęcia przez łożysko naczyń mózgu szczura, zmniejszono liczbę wstrzykiwanych hMSCs o połowę (do 10^6). Ta liczba komórek nadal powodowała zwolnienie przepływu krwi podczas ich infuzji, ale w ciągu kilku - kilkunastu minut dochodziło do powrotu prędkości przepływu krwi do wartości bazowych. Co ważne w tej zastosowanej metodzie nie obserwowano już występowania mikro-udarów, a więc ostatecznie opracowano także warunki eksperymentalne do dotętnicznych wstrzyknięć, także ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych. Przedmiotem kolejnych badań było ustalenie czy czynnikiem determinującym powstawanie mikro-udarów jest wielkość poszczególnych komórek, czy rzeczywista wstrzykiwana ich objętość. Ponieważ objętość jednej ludzkiej mezenchymalnej komórki macierzystej jest 4-krotnie większa niż glejowej komórki progenitorowej (GRP), wykonano infuzję 8 milionów GRPs, co odpowiada 2 milionom hMSCs – dawce powodującej mikro-udary. Okazało się jednak, że wstrzyknięcie nawet takiej dużej dawki glejowych komórek progenitorowych nie powodowało ani zaburzeń prędkości przepływu krwi, ani nie sprzyjało wystąpieniu mikro-udarów. To oznacza, że jednostkowa duża średnica ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych odgrywa znaczącą rolę w występowaniu mikro-udarów, i na ten aspekt należy zwrócić uwagę w przypadku stosowania tej drogi do transplantacji mezenchymalnych komórek macierzystych w klinice. Podsumowując, ustalono, że szybkość infuzji i wielkość przeszczepianych komórek stanowią główne determinanty bezpieczeństwa podań dotętnicznych oraz opracowano wartości tych czynników w celu bezpiecznego podawania zarówno glejowych komórek progenitorowych jak i ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych. Ta praca cieszy się wśród badaczy ogromnym zainteresowaniem, od momentu jej opublikowania w czerwcu 2013r była cytowana 28 razy.

Wizualizacja przeszczepionych komórek w OUN biorców jest bardzo istotna. Obrazowanie komórkowe już od dawna jest stosowane zarówno w badaniach podstawowych jak i klinicznych, ale dotychczas możliwa była jedynie obserwacja komórek umiejscowionych w mózgu po ich zasiedleniu. W przypadku podań dotętnicznych kluczowe byłoby obrazowanie komórkowe w trakcie infuzji tak, aby można było na bieżąco reagować w trakcie trwania

procedury transplantacji, jeżeli komórki płyną w niewłaściwym kierunku lub tworzą mikro-zatory. Opracowaną przeze mnie metodę obrazowania komórkowego w czasie rzeczywistym opublikowano w **pracy nr 5**. Dotychczasowe procedury neuroendowaskularne były wykonywane na podglądzie fluoroskopii promieniami RTG, jednak brak znaczników komórkowych o wystarczającej czułości wykrywania promieniami RTG spowodował poszukiwanie nowych metod. W związku z tym MRI wydaje się być jedyną modalnością o wystarczającej zarówno czułości jak i rozdzielczości pozwalającej na obrazowanie komórkowe. Do tego celu używane są różne znaczniki komórek, o różnej czułości, a co za tym idzie o różnej szybkości akwizycji obrazu. Obrazowanie ruchu komórek w czasie rzeczywistym wymaga przede wszystkim bardzo szybkiej sekwencji impulsów RF – na poziomie 2-3 sekund, co pozwala na wyświetlanie na ekranie komputera ruchu komórek w postaci intuicyjnego filmu. Spośród wszystkich znaczników komórkowych nanocząstki tlenku żelaza charakteryzują się najwyższą czułością i to one zostały zastosowane przeze mnie w badaniach. Do akwizycji obrazu użyto zmodyfikowanej sekwencji impulsów EPI, która jest rutynowo stosowana w badaniach funkcjonalnego MRI, gdzie wykrywa się zmiany w ilości żelaza w tkance związane z aktywnością naczynioruchową mózgu. Ze względu na niewielkie endogennie występujące zmiany podczas aktywności naczynioruchowej konieczne jest uśrednianie wielu akwizycji przed i po zastosowaniu bodźca. Wprowadzenie żelaza do komórek daje bardzo duży kontrast i wystarczy jednorazowe zebranie obrazu w ciągu 2-3 sekund, aby poznać lokalizację przeszczepianych komórek. Sekwencja ta nie wymaga stosowania skomplikowanego przetwarzania obrazu, co pozwala na jej wyświetlanie na ekranie monitora w momencie zebrania obrazu i taki obraz może być odświeżany w czasie rzeczywistym, co powoduje tworzenie się filmu na ekranie w czasie rzeczywistym podczas podawania komórek do mózgu. W tej sekwencji jak i w innych, żelazo uwidaczniane jest w postaci hipointensywnych/negatywnych plam, co utrudnia odróżnianie go od tła i stanowi problem w śledzeniu losu komórek po przeszczepach. Jednak w przypadku wizualizacji komórek w czasie rzeczywistym nie stanowi to żadnej przeszkody, gdyż najpierw rejestruje się obraz wyjściowy, a następnie podawane komórki pojawiają się jako punkty lub plamy, co dodatkowo pozwala na przedstawienie ich jako „gorące punkty” na tle obrazu wyjściowego i dopóki pozycja badanego obiektu nie ulegnie zmianie w skanerze, pozwala to na bardzo dokładną lokalizację komórek. W taki sposób poddano badaniu komórki przeszczepione dotętniczo szczurom po 48 godz. od wykonania u szczurów eksperymentalnego uszkodzenia mózgu, używając warunków eksperymentalnych opracowanych i opisanych w publikacji nr 4. Umożliwiło to wykazanie, że podane komórki najpierw zasiedlają obszar peryferyjny uszkodzonej tkanki, a następnie centrum uszkodzenia, ale ostatecznie nie obserwowano różnicy w dystrybucji komórek w obrębie lezji. Jeżeli jednak celem dla dostarczenia komórek byłyby okolice peryferyjne uszkodzonej tkanki to wystarczyłoby przerwać podawanie komórek we właściwym momencie, na podstawie obrazu widzianego na ekranie monitora. Technika obrazowania komórek w czasie rzeczywistym umożliwiła także badanie wpływu czasu, jaki minął od wykonania uszkodzenia do podania komórek na szybkość napływu komórek do lezji oraz wielkości tego napływu. Stwierdzono, że przeszczepione dotętniczo komórki najwolniej i w najmniejszej liczbie napływają do zmienionych struktur w pierwszej dobie po uszkodzeniu mózgu, podczas gdy

w drugiej i trzeciej dobie ten napływ jest najszybszy i najbardziej rozległy. Natomiast przeszczep komórek w siódmej dobie od momentu wykonania uszkodzenia powoduje zarówno zwolnienie przepływu jak i zmniejsza liczbę napływających komórek. Dramatyczne różnice pomiędzy pierwszą i drugą dobą najpewniej wynikają z przyczyn czysto hemodynamicznych, gdyż obrazowanie w czasie rzeczywistym pozwala na uwidocznienie procesu napływu oraz odpływu komórek podczas trwającej procedury transplantacji. Prawdopodobnie w pierwszej dobie naczynia wciąż są nieuszkodzone i zwieracze przed-włośniczkowe mogą potencjalnie hamować dopływ krwi do zmienionej eksperymentalnie okolicy mózgu, aby zwiększać ciśnienie krwi w pozostałych okolicach mózgu, co może mieć znaczenie dla przetrwania naczyń i odżywianej przez nie tkanki w okolicy udaru. Natomiast w drugiej dobie najpewniej dochodzi do porażenia autoregulacji, co powoduje że większość krwi napływającej do tej półkuli trafia do uszkodzonego obszaru mózgu i w ten sposób wraz ze zwiększonym napływem krwi prowadzi to także do zwiększonego napływu przeszczepianych komórek. Natomiast w siódmej dobie w centralnej części lezji pojawia się jama, a okoliczne naczynia najpewniej ulegają albo zniszczeniu, albo naprawie, w związku z tym obserwuje się zarówno zmniejszenie szybkości pojawiania się napływających komórek oraz mniejszą ich liczbę. Tę metodę zastosowano również w eksperymentalnym modelu okluzyjnego udaru mózgu u szczura. Co ciekawe zastosowanie takiej samej techniki nie spowodowało napływu komórek do mózgu u tych zwierząt. Ponieważ przeszczepione komórki ekspresowały lucyferazę wykonano badanie metodą bioluminescencji całego ciała szczura w celu poszukiwania „zaginionych” komórek. Okazało się, że komórki dawcy ulokowały się w oku, pomimo, że główna tętnica oczna została wcześniej zamknięta. Najpewniej jednak przeszczepione komórki trafiły do oka przez mniejszą tętnicę oczną, która odchodzi w dalszym przebiegu tętnicy szyjnej wewnętrznej (odpowiednik miejsca odejścia tętnicy ocznej u człowieka), i która nie może być zamknięta w trakcie procedury chirurgicznej ze względu na warunki anatomiczne. Wydaje się, że powodem takiego stanu rzeczy może być wyższe ciśnienie w kole Willisa zaopatrywanym przez przeciwległą tętnicę szyjną wewnętrzną, które „spycha” wstrzykiwane komórki do mniejszej tętnicy ocznej, przez którą najpewniej zwiększa się przepływ w związku z zamknięciem większej tętnicy ocznej (główne odgałęzienie tętnicy skrzydłowo-podniebiennej). W porównaniu z eksperymentalnym modelem uszkodzenia mózgu po wstrzyknięciu ouabainy, którego konsekwencją są niewielkie zmiany struktur głębokich, okluzyjny udar mózgu jest bardzo duży i obejmuje większość półkuli, wobec czego może potencjalnie prowadzić do dodatkowych, ciężkich hemodynamicznych zaburzeń mózgowego przepływu krwi. W związku z tym wysunięto hipotezę o konieczności zwiększenia szybkości infuzji komórek w celu „przełamania” ciśnienia krwi w obrębie koła Willisa. W efekcie podwojono prędkość infuzji do 0.4 ml/min, która jest wciąż w bezpiecznym limicie prędkości podań dotętnicznych, co umożliwiło uwidocznienie napływu przeszczepianych komórek zarówno w MRI jak i metodą bioluminescencji do mózgu i brak ich lokalizacji w oku. Ten eksperyment wykazał, że w zależności od rodzaju i wielkości stanu chorobowego może być pożądana różna prędkość infuzji komórek, co z kolei nasunęło pytanie, czy jest możliwe wypracowanie optymalnych warunków podania komórek dla poszczególnych zwierząt zanim komórki w ogóle zostaną im wstrzyknięte. Pozwoliłoby to zarówno zmniejszyć liczbę przeszczepianych komórek jak i uniknąć potencjalnych działań niepożądanych, wynikających z niewłaściwej ich dystrybucji

w strukturach mózgu. Taka metoda byłaby przydatna w badaniach eksperymentalnych u gryzoni oraz absolutnie kluczowa do wstrzyknięć dotętnicznych w klinice. W konsekwencji przedmiotem dalszych badań były nanocząstki żelaza (Feraheme), preparat, który jest zarejestrowany i dostępny na rynku do szybkiego wyrównywania poziomu żelaza we krwi w ostrych stanach niedokrwistości. Podanie tego preparatu z większą prędkością (4 ml/min) umożliwiło uwidocznienie obszaru mózgu w tym modelu, podczas gdy zmniejszenie prędkości do 2 ml/min nie wykazało przepływu. Badanie MRI w czasie rzeczywistym pozwala na infuzję Feraheme jedynie przez kilka sekund w celu orientacji czy jest przepływ, co minimalizuje stosowaną dawkę żelaza. Szczególnie ważne jest to, że nanocząstki żelaza nie pozostają w mózgu (także w zmienionym obszarze) i natychmiast odpływają, co potencjalnie pozwala na wielokrotne modyfikowanie warunków podania tak, aż osiągnie się zadowalające parametry umożliwiające skuteczne umieszczenie komórek w pożądanym obszarze tkanki. W ten sposób została opracowana metoda predykcji miejsca podania komórek drogą dotętniczną, co znacząco zwiększa precyzję tej drogi transplantacji komórek. Ponieważ ta metoda może mieć szczególne znaczenie dla dotętnicznych podań klinicznych rozpoczęto jej testowanie u dużych zwierząt stosując kliniczny skaner MRI. W pierwszym etapie dostosowano sekwencję MRI oraz wykazano, że możliwa jest obserwacja napływu komórek do mózgu w czasie rzeczywistym u świń. Z punktu widzenia klinicznego bardzo interesującym jest to, czy można przewidzieć określony obszar mózgu przy pomocy pre-iniekcji środka kontrastowego (nanocząstki tlenku żelaza), do którego trafią następnie komórki. Ze względu na istnienie sieci wrotnej u podstawy mózgu u świni niemożliwe jest wprowadzenie cewnika do naczyń mózgowych, a co za tym idzie także ich selektywne cewnikowanie. W związku z tym dalsze eksperymenty wykonano u psa, którego topografia naczyń zewnątrz- i wewnątrz-mózgowych odpowiada tej u ludzi. Aby osiągnąć zamierzony przez nas cel wprowadzono mikro-cewnik do tętnicy środkowej mózgu u psa, a następnie wstrzyknięto nanocząstki żelaza, które uwidoczniły obszar mózgu zaopatrywany przez cewnik (wykonanie tego metodą fluoroskopii promieni RTG jest niemożliwe ze względu na słabą czułość środków kontrastowych, które są praktycznie niewidoczne przy tak powolnych iniekcjach komórek, a z kolei ta niewielka szybkość infuzji jest niezbędna w celu precyzyjnego celowania w odpowiedni obszar mózgu). Po przeszczepie komórek wykazano, że gromadzą się one dokładnie w miejscu poprzednio wyznaczonym przez środek kontrastujący, co stanowi dowód, że ostateczną lokalizację dotętniczo podawanych komórek można przewidzieć poprzez pre-iniekcję środka kontrastowego. Ten sam środek kontrastowy został użyty do wykazania, że naczynia, w których znajdują się podane komórki są wciąż drożne i ma w nich miejsce przepływ krwi. Lokalizacja przeszczepianych komórek zarówno w modelach eksperymentalnych u szczura jak i u psa została potwierdzona histologicznie.

Mózg jest stosunkowo łatwym celem do obrazowania ze względu na homogenność magnetyczną, podczas gdy obrazowanie w obrębie rdzenia kręgowego jest zwykle utrudnione z uwagi na liczne artefakty, stąd kolejnym etapem naszych badań były eksperymenty z możliwością zastosowania opisanej powyżej techniki do obrazowania rdzenia kręgowego. W sekwencji EPI zawartość całego kanału kręgowego (zarówno rdzeń jak i płyn mózgowo-rdzeniowy) są białe i dotętnicza iniekcja komórek u psa przez tętnicę rdzeniową przednią (odpowiednik ludzkiej tętnicy Adamkiewicza) pozwoliło na hipointensywne uwidocznienie

przepływu przez rdzeń kręgowy, na tle hiperintensywnego płynu mózgowo-rdzeniowego otaczającego rdzeń kręgowy. Oddechowe artefakty ruchowe związane z czynnością oddychania nie odgrywają znaczącej roli w przypadku tak częstego próbkowania obrazu, (co 2-3 sekundy). Ponadto w odrębnych badaniach porównano przepływ mózgowy małych glejowych komórek progenitorowych i dużych mezenchymalnych komórek macierzystych. Tak jak spodziewaliśmy się, w oparciu o pośrednie zawarte w publikacji nr 4, glejowe komórki progenitorowe swobodnie przepływają przez naczynia mózgowe, podczas gdy mezenchymalne komórki macierzyste zatrzymują się w łożysku naczyniowym prawdopodobnie z powodu ich dużego rozmiaru. Ten fenomen został zilustrowany odpowiednimi filmami dołączonymi do pracy jako dane uzupełniające (supplementary data). Podsumowując wyniki badań będących przedmiotem tej publikacji, opracowano metodę obrazowania podawania komórek drogą dotętniczną w MRI w czasie rzeczywistym, a następnie opracowano sposób predykcji obszaru mózgu, do którego trafiają one po infuzji. Te procedury zostały przetestowane u dużych zwierząt używając klinicznych skanerów MRI, co sprawia, że metoda jest gotowa do zastosowanie w klinice.

Badania prowadzone w moim zespole wskazują na możliwość przechodzenia komórek, poddanych odpowiednim modyfikacjom genetycznym, z naczyń do miejsc uszkodzenia w mózgu (dane nieopublikowane). Należy jednak pamiętać, iż po uszkodzeniu mózgu następuje otwarcie bariery krew-mózg a naczynia mózgowe wykazują zwiększoną ekspresję receptorów dla molekuł adhezyjnych. Jeżeli więc chciałoby się dotętniczną drogę podania zastosować w szerokim wachlarzu chorób neurologicznych konieczne jest spowodowanie odpowiednich warunków w obrębie naczyń mózgowych. Wydaje się, że otwarcie bariery krew-mózg może być pierwszym i kluczowym elementem ułatwiającym przechodzenie komórek ze światła naczyń do parenchymy mózgu. Istnieją różne metody otwarcia bariery krew-mózg, ale moje szczególne zainteresowanie zostało skierowane na metodę hiperosmolarną ze względu na dotętniczną drogę aplikacji i możliwość jej połączenia z podaniem komórek w trakcie jednej procedury. Metoda hiperosmolarna była testowana w klinice od lat w leczeniu pacjentów z guzami mózgu, jednak ze względu na małą precyzję i brak powtarzalności została ona niemalże zarzucona. Zatem w **pracy nr 6** zbadano możliwość otwarcia bariery krew-mózg, używając tej samej techniki interwencyjnej jak w pracy nr 5, ale w sposób wystarczająco precyzyjny, aby była przydatna do zastosowań transplantacji komórek. Taka technika byłaby również bardzo przydatna do infuzji domózgowych różnych leków. Badania przeprowadzono na królikach, z uwagi na to, iż stanowią one najmniejsze z dostępnych zwierząt laboratoryjnych, u których można zastosować kliniczną metodę neurointerwencji. W doświadczeniach wprowadzano cewnik do tylnego kręgu mózgowego i badaniu poddawano obszar pnia mózgu. Szczególnym zainteresowaniem była kwestia, czy tak jak w przypadku komórek można przewidzieć miejsce otwarcia bariery krew-mózg. Tylny krąg stanowi szczególnie wyzwanie ze względu na liczne drobne naczynia odchodzące od dużych pni naczyniowych. Do predykcji obszaru otwarcia użyto nanocząstek żelaza podanych dotętnicznie, natomiast 25 % roztwór mannitolu został zastosowany, jako środek hiperosmolarny, po czym, w celu uwidocznienia obszaru otwarcia bariery krew-mózg, dożylnie podawano kontrast oparty o gadolinium (Magnevist). Stosowano również błękit Evans'a wstrzykiwany dożylnie, aby móc zobaczyć ten

obszar mózgu w badaniu pośmiertnym. Wyniki badań uwidoczniły dużą zmienność osobniczą królików jeśli chodzi o ustalenie optymalnych parametrów przepływu przy za stosowaniu nanocząstek tlenku żelaza. To dowodzi konieczności ustalania warunków iniekcji indywidualnie dla każdego pacjenta. Wykazano także, że nawet niewielka repozycja końcówki cewnika może diametralnie zmieniać obszar mózgu zaopatrywany przez cewnik, co tym bardziej wskazuje na istotność wykonywania predykcji otwarcia bariery krew-mózg. Nasze badania potwierdziły, że bariera-krew mózg otwiera się w miejscu uprzednio wskazanym przez nanocząstki tlenku żelaza, z silną korelacją obu obrazów oraz wysokim współczynnikiem predykcyjnym. Wykazano, że hiperosmolarne otwarcie bariery krew-mózg jest bezpieczne, a zwierzę obserwowane w dłuższym czasie po interwencji chirurgicznej nie wykazywało żadnych objawów niepożądanych oraz zmian w obrazie MRI. Podsumowując ten etap moich badań jasno wynika, że wykorzystując monitorowanie MRI w procedurach neuroradiologii interwencyjnej możliwa jest precyzyjna predykcja miejsca otwarcia bariery krew-mózg, co w przyszłości może ułatwić dotętniczą aplikację komórek przeszczepianych w szerokim spektrum chorób neurologicznych.

Opis metod znakowania i obrazowania komórkowego

Wraz z rozwojem medycyny regeneracyjnej rośnie zapotrzebowanie na obrazowanie wszczepianych komórek w celu zapewnienia odpowiedniej precyzji ich podania. Obecnie istnieje bardzo dużo różnych metod obrazowania komórkowego, w związku z tym **w publikacji nr 7** dokonałem bardzo szerokiej analizy dostępnych metod, także w kontekście nadchodzenia medycyny spersonalizowanej. Otóż znakowanie komórek i ich podawanie pod kontrolą obrazowania, jak i dalsze śledzenie ich losu pozwala na dostosowywanie terapii do potrzeb poszczególnych pacjentów. W swojej pracy sformułowałem konieczność dostosowania zarówno modalności obrazowania komórkowego jak i użytego znacznika do każdego pacjenta, ze zwróceniem uwagi na pierwotny proces chorobowy jak i współistniejące dolegliwości, które także mogą wymagać obrazowania w celu oceny zarówno postępu choroby jak i wyników leczenia. Poza tym zmiany chorobowe mogą wpływać na jakość otrzymywanych obrazów oraz pogarszać możliwości zobaczenia przeszczepionych komórek. Koncepcja dostosowania rodzaju obrazowania komórkowego do patologii pacjenta została zaproponowana przeze mnie i nazwana „oknem obrazowania” (z ang. imaging window), czyli każdy pacjent ze względu na swoją indywidualną specyfikę ma do dyspozycji pewne „okno” metod obrazowych, które nie interferują z jego aktualnymi potrzebami diagnostycznymi.

Rezonans magnetyczny odznacza się bardzo wysoką rozdzielczością przestrzenną oraz wysoką czułością środków kontrastowych wobec tego jest wiodącą metodą używaną do obrazowania komórkowego. Niestety wiele znaczników komórkowych, szczególnie opartych o żelazo może interferować z innymi zastosowaniami tej metody badania takimi jak funkcjonalny MRI, czy ocena dyfuzji wody w tkance. W związku z tym coraz większym zainteresowaniem cieszą się metody nie zaburzające anatomicznych i funkcjonalnych badań MRI. Polegają one bądź na zastosowaniu detekcji innych jąder niż wodoru, lub nowych mechanizmów kontrastowych jak detekcja wymiany atomów wodoru pomiędzy wodą, a poszczególnymi

grupami chemicznych, którą można „włączać” i „wyłączać”. Jednak one wciąż się cechują mniejszą czułością niż tradycyjne środki kontrastowe, co ma szczególne znaczenie w przypadku konieczności bardzo szybkiej akwizycji obrazu. Jednak znakowanie komórkowe przy użyciu środków kontrastowych pozwala jedynie na wskazanie na lokalizację komórki jednak nie pozwala wnioskować o żywotności komórki. Do tego celu niezbędne są geny reporterowe, których produkty także próbuje się obrazować w MRI, jednak w tym przypadku są nawet jeszcze większe problemy z czułością.

Bardzo dużą i szeroko stosowaną modalnością w obrazowaniu komórkowym jest także medycyna nuklearna. Charakteryzuje się łatwością znakowania, bardzo dużą czułością i brakiem interferencji z innymi metodami obrazowania, jednak jej podstawową wadą jest krótkotrwałość środków kontrastowych, co pozwala na obrazowanie jedynie w ciągu godzin i w niektórych przypadkach dni. Poza tym akwizycja obrazu jest zbyt wolna do zastosowań obrazowania w czasie rzeczywistym. W przypadku tej modalności większy sukces odniósł gen reporterowy, który pozwala na gromadzenie promieniotwórczego znacznika i w ten sposób wskazanie miejsca gromadzących go przeszczepionych komórek. Jednak ograniczeniem tej technologii jest układ nerwowy z powodu braku przechodzenia znacznika przez barierę krew-mózg. Poza tym dawka promieniowania otrzymana przez poszczególne przeszczepione komórki może być mutagenna, co niestety może się ujawnić dopiero po latach w postaci nowotworu pochodzącego z przeszczepu.

Chociaż próbuje się stosować obrazowanie komórkowe promieniami RTG, to w tym przypadku czułość środków kontrastowych, nawet tych najlepszych jak nanocząstki złota, czy tantalu nie jest satysfakcjonująca. To samo można powiedzieć o detekcji komórek znakowanych mikropęcherzykami powietrza (lub innych gazów) przy pomocy ultrasonografii.

Powyżej wymienione metody charakteryzują się możliwością klinicznego zastosowania, natomiast obecnie mamy do czynienia z bardzo dużym rozkwitem metod optycznych, które są bardzo czułe, specyficzne i stosowane w formie genów reporterowych, jednak ze względu na absorpcję światła przez tkanki nie mogą one zostać użyte w klinice. Szczególnie szerokie zastosowanie znalazła bioluminescencja, której zastosowanie zostało szczególnie szeroko opisywane w poprzednich częściach autoreferatu.

W swojej pracy przeglądowej także omówiłem główne cele obrazowania komórkowego. Podstawową przyczyną zastosowania tej technologii jest poznanie dystrybucji przeszczepianych komórek, co ma szczególne znaczenie w przypadku użycia płynów ustrojowych jako nośników komórek. Transplantacje donaczyniowe lub do płynu mózgowo-rdzeniowego cechują się mniejszą inwazyjnością, ale kosztem mniejszej pewności, co do ostatecznej lokalizacji komórek i w tym przypadku znajomość dystrybucji komórek jest szczególnie istotna. Do oceny dystrybucji komórek wystarczający jest jakikolwiek znacznik komórkowy. Dużo trudniejsza jest ocena przeżywalności wszczepionych komórek, gdyż znacznik komórkowy musi zniknąć wraz ze śmiercią komórki. Najbardziej miarodajne są produkty genów reporterowych, szczególnie wykazujące się krótkim okresem półtrwania oraz stosunkowo wysokim sygnałem takie jak lucyferaza. Jednak ze względu na absorpcję tkankową optyczne geny reporterowe nie są w stanie „przebić” światła poza ciało większych zwierząt i ludzi, a więc są bezużyteczne klinicznie. Pozostałe strategie charakteryzują się zbyt niską

czułością, chociaż pośrednio można się dowiedzieć o przeżyciu komórek stosując znaczniki PET. Ponieważ zwykle przeszczepia się niedojrzałe komórki macierzyste, obrazowanie czy proces ich różnicowania po przeszczepie przebiega właściwie jest bardzo zasadne. Jednak w tym przypadku trudność jest większa, gdyż musi być obecny specjalny gen promotorowy sprzężony z określonym genem charakterystycznym dla pewnego stadium różnicowania i musi on być ekspresowany w wystarczającej ilości pozwalającej na detekcję na zewnątrz organizmu. Dotychczas tylko optyczne geny reporterowe okazały się skuteczne, oczywiście tylko u małych zwierząt.

b) Omówienie ewentualnego wykorzystania osiągniętych wyników

Badania nad zastosowaniem obrazowania zwierząt w celu optymalizacji metod ochrony przeszczepu przed odrzuceniem wykazały dramatyczne różnice w przeżywalności przeszczepów, co pozwala antycypować, że podobna sytuacja zachodzi u pacjentów i może stanowić wy tłumaczenie znaczącej zmienności wyników obserwowanych w kontrolowanych próbach klinicznych. Natomiast bioluminescencja jest już obecnie szeroko stosowana do oceny strategii immunosupresyjnych.

Wykazanie, że komórki przeszczepione do istoty białej łatwiej zostają odrzucane zostało zastosowane w badaniach kolejnych strategii immunosupresyjnych lub indukcji tolerancji, z których jedna jest bardzo obiecująca do zastosowania w klinice, a odpowiednia kolejna publikacja na ten temat jest obecnie w przygotowaniu. Bardzo ważne było także wykazanie uszkodzenie tkanki podczas wkłuc i bezpośrednich wstrzyknięć komórek do mózgu, co stanowiło kanwę do poszukiwań mniej inwazyjnych i bezpieczniejszych metod transplantacji komórek do OUN.

Opracowanie dokładnych warunków bezpiecznego podania komórek do mózgu drogą dotętniczą pozwoliło na rozprzestrzenienie się tej drogi podania, o czym świadczą liczne cytowania tej pracy. Przyczyniło się to także do uwiarygodnienia tej drogi podania komórek macierzystych. Dodanie metody obrazowania komórek w czasie rzeczywistym stanowi kolejny element całościowego podejścia do podawania komórek macierzystych drogą dotętniczą. Precyzyjne i przewidywalne otwarcie bariery krew mózg drogą dotętniczą zostało opatentowane i zyskało zainteresowanie firm biotechnologicznych, które chciałyby wykorzystać tę metodę do podawania wyprodukowanych przez siebie leków. W związku z tym wraz z współpracownikami podjęliśmy wysiłek utworzenia spin-off, w celu wytworzenia, rejestracji, zdobycia wszystkich niezbędnych pozwoleń i ostatecznie wprowadzenia tej metody na rynek. Metoda ta może już zostać użyta do podawania leków, a w przyszłości może być także zastosowana klinicznie do podawania komórek macierzystych.

Bibliografia:

1. Capetian, P., R. Knoth, J. Maciaczyk, G. Pantazis, M. Ditter, L. Bokla, G. B. Landwehrmeyer, B. Volk and G. Nikkhah (2009). "Histological findings on fetal striatal grafts in a Huntington's disease patient early after transplantation." *Neuroscience* **160**(3): 661-675.

2. Chua, J. Y., A. V. Pendharkar, N. Wang, R. Choi, R. H. Andres, X. Gaeta, J. Zhang, M. E. Moseley and R. Guzman (2011). "Intra-arterial injection of neural stem cells using a microneedle technique does not cause microembolic strokes." J Cereb Blood Flow Metab **31**(5): 1263-1271.
3. Czyz, M., P. Tabakow, I. Hernandez-Sanchez, W. Jarmundowicz and G. Raisman (2015). "Obtaining the olfactory bulb as a source of olfactory ensheathing cells with the use of minimally invasive neuroendoscopy-assisted supraorbital keyhole approach--cadaveric feasibility study." Br J Neurosurg **29**(3): 362-370.
4. Freed, C. R., P. E. Greene, R. E. Breeze, W. Y. Tsai, W. DuMouchel, R. Kao, S. Dillon, H. Winfield, S. Culver, J. Q. Trojanowski, D. Eidelberg and S. Fahn (2001). "Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease." New Engl J Med **344**(10): 710-719.
5. Gorelik, M., I. Orukari, J. Wang, S. Galpoththawela, H. Kim, M. Levy, A. A. Gilad, A. Bar-Shir, D. A. Kerr, A. Levchenko, J. W. Bulte and P. Walczak (2012). "Use of MR cell tracking to evaluate targeting of glial precursor cells to inflammatory tissue by exploiting the very late antigen-4 docking receptor." Radiology **265**(1): 175-185.
6. Hallett, P. J., M. Deleidi, A. Astradsson, G. A. Smith, O. Cooper, T. M. Osborn, M. Sundberg, M. A. Moore, E. Perez-Torres, A. L. Brownell, J. M. Schumacher, R. D. Spealman and O. Isacson (2015). "Successful function of autologous iPSC-derived dopamine neurons following transplantation in a non-human primate model of Parkinson's disease." Cell Stem Cell **16**(3): 269-274.
7. Hu, Y., N. Liu, P. Zhang, C. Pan, Y. Zhang, Y. Tang, H. Deng, M. Aimaiti, H. Zhou, G. Wu and Z. Tang (2015). "Preclinical Studies of Stem Cell Transplantation in Intracerebral Hemorrhage: a Systemic Review and Meta-Analysis." Mol Neurobiol. 2015 Sep 26. [Epub ahead of print]
8. Janowski, M., D. C. Wagner and J. Boltze (2015). "Stem Cell-Based Tissue Replacement After Stroke: Factual Necessity or Notorious Fiction?" Stroke **46**(8): 2354-2363.
9. Janowski, M., P. Walczak and I. Date (2010). "Intravenous route of cell delivery for treatment of neurological disorders: a meta-analysis of preclinical results." Stem Cells Dev **19**(1): 5-16.
10. Kefalopoulou, Z., M. Politis, P. Piccini, N. Mencacci, K. Bhatia, M. Jahanshahi, H. Widner, S. Rehncrona, P. Brundin, A. Bjorklund, O. Lindvall, P. Limousin, N. Quinn and T. Foltynie (2014). "Long-term clinical outcome of fetal cell transplantation for Parkinson disease: two case reports." JAMA Neurol **71**(1): 83-87.
11. Kelly, C. M., S. V. Precious, C. Scherf, R. Penketh, N. N. Amso, A. Battersby, N. D. Allen, S. B. Dunnett and A. E. Rosser (2009). "Neonatal desensitization allows long-term survival of neural xenotransplants without immunosuppression." Nat Methods **6**(4): 271-273.
12. Lees, J. S., E. S. Sena, K. J. Egan, A. Antonic, S. A. Koblar, D. W. Howells and M. R. Macleod (2012). "Stem cell-based therapy for experimental stroke: a systematic review and meta-analysis." Int J Stroke **7**(7): 582-588.
13. Lindvall, O., P. Brundin, H. Widner, S. Rehncrona, B. Gustavii, R. Frackowiak, K. L. Leenders, G. Sawle, J. C. Rothwell, C. D. Marsden and et al. (1990). "Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease." Science **247**(4942): 574-577.
14. Mattis, V. B., D. R. Wakeman, C. Tom, H. B. Dodiya, S. Y. Yeung, A. H. Tran, K. Bernau, L. Ornelas, A. Sahabian, J. Reidling, D. Sareen, L. M. Thompson, J. H. Kordower and C. N. Svendsen (2014). "Neonatal immune-tolerance in mice does not prevent xenograft rejection." Exp Neurol **254**: 90-98.

15. Olanow, C. W., T. Freeman and J. Kordower (2001). "Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease." N Engl J Med **345**(2): 146; author reply 147.
16. Peng, W., J. Sun, C. Sheng, Z. Wang, Y. Wang, C. Zhang and R. Fan (2015). "Systematic review and meta-analysis of efficacy of mesenchymal stem cells on locomotor recovery in animal models of traumatic brain injury." Stem Cell Res Ther **6**: 47.
17. Pereira, M., U. Pfisterer, D. Rylander, O. Torper, S. Lau, M. Lundblad, S. Grealish and M. Parmar (2014). "Highly efficient generation of induced neurons from human fibroblasts that survive transplantation into the adult rat brain." Sci Rep **4**: 6330.
18. Riecke, J., K. M. Johns, C. Cai, F. S. Vahidy, K. Parsha, E. Furr-Stimming, M. Schiess and S. I. Savitz (2015). "A Meta-Analysis of Mesenchymal Stem Cells in Animal Models of Parkinson's Disease." Stem Cells Dev **24**(18): 2082-2090.
19. Steinbeck, J. A., S. J. Choi, A. Mrejeru, Y. Ganat, K. Deisseroth, D. Sulzer, E. V. Mosharov and L. Studer (2015). "Optogenetics enables functional analysis of human embryonic stem cell-derived grafts in a Parkinson's disease model." Nat Biotechnol **33**(2): 204-209.
20. Tabakow, P., W. Jarmundowicz, B. Czapiga, W. Fortuna, R. Miedzybrodzki, M. Czyz, J. Huber, D. Szarek, S. Okurowski, P. Szewczyk, A. Gorski and G. Raisman (2013). "Transplantation of autologous olfactory ensheathing cells in complete human spinal cord injury." Cell Transplant **22**(9): 1591-1612.
21. Tabakow, P., G. Raisman, W. Fortuna, M. Czyz, J. Huber, D. Li, P. Szewczyk, S. Okurowski, R. Miedzybrodzki, B. Czapiga, B. Salomon, A. Halon, Y. Li, J. Lipiec, A. Kulczyk and W. Jarmundowicz (2014). "Functional regeneration of supraspinal connections in a patient with transected spinal cord following transplantation of bulbar olfactory ensheathing cells with peripheral nerve bridging." Cell Transplant **23**(12): 1631-1655.
22. Takahashi, K., K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda and S. Yamanaka (2007). "Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors." Cell **131**(5): 861-872.
23. Takahashi, K. and S. Yamanaka (2006). "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors." Cell **126**(4): 663-676.
24. Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknitz, J. J. Swiergiel, V. S. Marshall and J. M. Jones (1998). "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts." Science **282**(5391): 1145-1147.
25. Vu, Q., K. Xie, M. Eckert, W. Zhao and S. C. Cramer (2014). "Meta-analysis of preclinical studies of mesenchymal stromal cells for ischemic stroke." Neurology **82**(14): 1277-1286.
26. Zhao, T., Z. N. Zhang, Z. Rong and Y. Xu (2011). "Immunogenicity of induced pluripotent stem cells." Nature **474**(7350): 212-215.

Miloslav Jovanov