

AUTOREFERAT

1. **Imię i Nazwisko:** Anna Otylia Sarnowska
2. **Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.**
 - 2000** stopień magistra nauk biologicznych, specjalność biotechnologia, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski
 - 2002** tytuł lekarza medycyny, II Wydział Lekarski, Akademia Medyczna w Warszawie
 - 2007** tytuł doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej, temat pracy doktorskiej „Mechanizmy działania wybranych związków neuroprotektynowych w uszkodzeniu ischemicznym neuronów sektora CA1 hipokampa”, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego, PAN – promotor, prof. Krystyna Domańska-Janik
 - 2013** tytuł specjalisty neurologa
3. **Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych.**
 - 2000-2014** Zakład Neurobiologii Naprawczej; IMDiK PAN im. M. Mossakowskiego w Warszawie – asystent, a następnie adiunkt
 - 2014-obecnie** Pracownia Bioinżynierii Komórek Macierzystych; IMDiK PAN im. M. Mossakowskiego w Warszawie, adiunkt
 - 2014-obecnie** Platforma Badań Translacyjnych Medycyny Regeneracyjnej; IMDiK PAN im. M. Mossakowskiego w Warszawie – kierownik
 - 2002-2003** Szpital CSK MSWiA ul. Wołoska – stażysta
 - 2006-obecnie** Klinika Neurologii i Epileptologii CMKP SPSK im. Prof. W. Orłowskiego w Warszawie – starszy asystent
4. **Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):**
 - a) tytuł osiągnięcia naukowego:
Analiza czynników potęgujących właściwości regeneracyjne komórek macierzystych/progenitorowych stosowanych w terapii OUN

b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, recenzenci wydawniczy),

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

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: sformułowaniu hipotezy badawczej, zaplanowaniu i kierowaniu projektem badawczym, w tym zaplanowaniu szczegółowym wszystkich doświadczeń, wykonaniu badań dotyczących neuroprotekcijnego oddziaływania WJ-MSC na OHC, interpretacji wyników i wiodącej roli w napisaniu, a następnie dyskusji z recenzentami, edycji ostatecznej wersji manuskryptu.

Mój indywidualny udział w autorstwie pracy szacuję na 65%

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

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: sformułowaniu hipotezy badawczej, opracowaniu metody izolacji i hodowli podłużnych skrawków rdzenia kręgowego szczura, zaplanowaniu i kierowaniu projektem badawczym, interpretacji wyników, napisaniu, a następnie dyskusji z recenzentami i edycji ostatecznej wersji manuskryptu.

Mój indywidualny udział w autorstwie pracy szacuję na 80%

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 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; MNiSW: 35; liczba cytowań: 8

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: zaplanowaniu szczegółowym wszystkich doświadczeń dotyczących badań ex vivo, współwykonaniu wszystkich doświadczeń dotyczących transplantacji szkieletów do nieuszkodzonych i uszkodzonych mózgów szczura, interpretacji wyników i wiodącej roli w napisaniu, a następnie dyskusji z recenzentami i edycji ostatecznej wersji manuskryptu.

Mój indywidualny udział w autorstwie pracy szacuję na 65%

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

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: przeprowadzeniu doświadczeń dotyczących współhodowli OPC i OHC, w tym wykonaniu badań dotyczących neuroprotektynnego oddziaływania OPC na OHC zawartych w pracy, interpretacji wyników dotyczących tej części pracy, udziale w pisaniu pracy.

Mój indywidualny udział w autorstwie pracy szacuję na 20%

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

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: sformułowaniu hipotezy badawczej, zaplanowaniu i przeprowadzeniu wszystkich doświadczeń zawartych w pracy, interpretacji wyników, napisaniu, a następnie dyskusji z recenzentami i edycji ostatecznej wersji manuskryptu.

Mój indywidualny udział w autorstwie pracy szacuję na 80%

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

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: zaplanowaniu szczegółowym wszystkich doświadczeń dotyczących badań ex vivo, opracowaniu metod transplantacji HUCB-NSC w postaci zawiesiny lub neurosfer na nieuszkodzone lub poddane deprywacji glukozy i tlenu skrawki hipokampa szczura, analizie immunohistochemicznej, interpretacji wyników i wiodącej roli w napisaniu, a następnie dyskusji z recenzentami i edycji ostatecznej wersji manuskryptu.

Mój indywidualny udział w autorstwie pracy szacuję na 70%

Osiągnięcie zostało udokumentowane cyklem 6 oryginalnych prac naukowych, 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.

- c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Podstawą decyzji o zastosowaniu terapii komórkowej, która ciągle jeszcze pozostaje w fazie eksperymentalnej terapii klinicznej w chorobach OUN, jest brak innych rekomendowanych i standardowych opcji leczniczych. Powodzenie terapii jest natomiast związane z takimi czynnikami jak właściwy dobór rodzaju komórek macierzystych (KM) w zależności od podłoża choroby, ściśle określenie oczekiwań terapeutycznych związanych z zastosowanym leczeniem, z optymalizacją funkcjonalną przeszczepianych komórek *in vitro* oraz właściwą drogą i sposobem podania przeszczepu. Obecnie intensywne badania nad zastosowaniem KM w chorobach neurologicznych koncentrują się głównie na szczegółowym sprecyzowaniu powodów dużej zmienności efektów leczniczych osiąganych przez poszczególne grupy badaczy. Wydaje się, że w celu osiągnięcia jednoznacznych i powtarzalnych efektów konieczne jest wprowadzone precyzyjnych standardów postępowania w odniesieniu do konkretnych chorób.

Obecnie w badaniach klinicznych zastosowanie znalazły głównie mezenchymalne komórki macierzyste (MSC) ze względu na łatwość dostępu, brak kontrowersyjności etycznej oraz stosunkowo duże bezpieczeństwo przeszczepów, w tym również allogenicznych. Mając na uwadze translację wyników badań podstawowych do terapii klinicznej, do prowadzonej przez mnie analizy czynników warunkujących losy przeszczepu została wybrana ta właśnie grupa komórek. Zaznaczenia może wymagać dwuznaczność stosowanego powszechnie skrótu: MSC (mesenchymal stem cells), który zasadniczo powinien przysługiwać jedynie homogennej populacji KM scharakteryzowanych *in vitro* (Caplan i wsp. 2017), o znaczącym potencjale klonogennym oraz ekspresji genów pluripotencjalnych (Sandvig i wsp. 2017). Obecnie komórki pozyskiwane ze szpiku kostnego, tkanki tłuszczowej lub krwi pępowinowej, zwane nieprawidłowo, ale dość powszechnie, mezenchymalnymi komórkami macierzystymi (MSC), stanowią heterogenną frakcję stromalną (podścieliskową) lub w przypadku krwi pępowinowej subpopulację jednojądrzastych komórek. Frakcje te zawierają bardzo niewielką (ok. >1-5%) liczbę klonogennych (właściwych) komórek macierzystych (Kuroda i wsp. 2014). Dopiero w wyniku ukierunkowanej, selektywnej hodowli i segregacji *in vitro* można zwiększyć liczbę tych komórek przed transplantacją.

Nadrzędnym celem terapii regeneracyjnej z zastosowaniem KM od początku była odbudowa uszkodzonej w wyniku procesu chorobowego sieci neuralnej. W tym celu optymalne wydaje się podawanie komórek macierzystych/progenitorów neuralnych lub

komórek macierzystych MSC, posiadających wysoki potencjał do różnicowania się w tym kierunku. Pozyskiwane z neurogennych obszarów mózgu płodów komórki macierzyste to źródło nadal kontrowersyjne etycznie i niewystarczające ilościowo, choć rekonstrukcyjnie optymalne. Bardziej dostępną możliwością dla terapii rekonstrukcyjnej wydają się komórki o cechach pluripotencji, obecne w niewielkiej liczbie, głównie w okresie okołoporodowym w tkankach płodu: krwi pępowinowej, łożysku, płynie owodniowym czy sznurze pępowiny (galarety Whartona – WJ-MS). Możliwość otrzymania drogą długotrwałej selekcji pełnego różnicowania neuralnego komórek jednojądrzastych krwi pępowinowej została wykazana po raz pierwszy w naszym zespole już ponad 15 lat temu (Bużańska i wsp. 2002). Cecha ta została potwierdzona poprzez wyprowadzenie nietransformowanej linii neuralnych KM (HUCB-NSC) wykazujących zdolność wydzielania neuroprzekaźników, aktywność elektrofizjologiczną kanałów jonowych (Sun i wsp. 2005, Bużańska i wsp. 2006) oraz cechy spontanicznej aktywności elektrycznej w hodowli *in vitro* (Jurga i wsp. 2009).

Wraz z otrzymaniem powyższej populacji komórek posiadających udowodniony potencjał neuralny *in vitro*, rozpoczęto analizę czynników mogących wpływać na ich los przed i po przeszczepie.

Wpływ miejsca przeszczepu na przeżycie, integrację i migrację KM

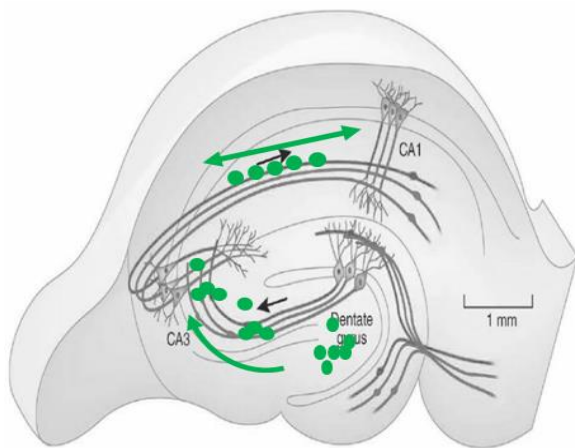
(Sarnowska, Jurga i wsp. 2009)

Jako uproszczoną alternatywę dla przeszczepu *in vivo* zastosowaliśmy długoterminową organotypową hodowlę skrawków hipokampa szczura (OHC) (Sarnowska i wsp. 2002). W powyższym modelu badaliśmy dwustronne oddziaływanie pomiędzy przeszczepionymi komórkami macierzystymi, a tkanką gospodarza *ex-vivo*. Ten typ hodowli można uznać za rodzaj redukcjonistycznego modelu przeszczepu do mózgu, w którym wykluczono bezpośredni wpływ ogólnoustrojowej homeostazy i systemowej odpowiedzi immunologicznej na przeszczep. Organotypowe hodowle skrawkowe zostały zaakceptowane jako przydatny model posiadający właściwości zarówno hodowli komórkowej, jak i modelu zwierzęcego. Skrawki organotypowe w porównaniu z mieszanymi hodowlami komórkowymi (neurony, astrocyty i oligodendrocyty) zachowują prawidłową cytoarchitekturę tkanki, utrzymują funkcjonalne połączenia i szlaki przekazywania oraz naturalne połączenia międzykomórkowe, a zatem lepiej mogą odtwarzać naturalne środowisko przeszczepu. Progenitory neuralne wyprowadzonej z krwi pępowinowej linii były transplantowane na tkankę hipokampa w postaci zawiesiny pojedynczych komórek (HUCB-NSC), lub w postaci neurosfer

(wielokomórkowych agregatów niezróżnicowanych NSC), pozyskanych w pożywce wolnej od surowicy *in vitro* (N-HUCB). HUCB-NSC w postaci zawiesiny były równomiernie nanoszone na skrawek hipokampa. W odróżnieniu od tego sposobu podania, neurosfery były nasadzane w konkretne rejony hipokampa: zakręt zębaty, rejon CA lub korę śródwęchową (gyrus dentatus - DG, cornu ammonis - CA, enthorinal cortex - EC), naśladując przeszczepy miejscowe, intraparenchymalne (miąższowe).

Nasze obserwacje koncentrowały się głównie na ocenie zdolności tych przeszczepów do wbudowywania się w sieci neuronalne gospodarza oraz na wpływie czasu i miejsca przeszczepu na ich zdolność do migracji i różnicowania w obrębie określonej cytoarchitektury hipokampa.

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



Schemat przedstawiający włókna projekcyjne w hipokampie. Na zielono zaznaczone transplantowane komórki oraz szlaki ich migracji

endogennego ruchu neuroblastów (Jin i wsp. 2001, Nakatomi i wsp. 2002, Sugino i wsp. 2006). Osiągając region CA, różnicowały się i włączały w istniejącą cytoarchitekturę tkanki. Przeciwnie, komórki transplantowane jako neurosfery do regionu EC pozostawały niezróżnicowane (spoczynkowe) przez cały okres naszej obserwacji. Podobne zachowanie KM opisano w modelu *in vivo*. KM po transplantacji do regionu SVZ szczura, podlegały endogennym sygnałom warunkującym ich ukierunkowaną migrację wzdłuż tzw. „rostral migratory stream (RMS)”

do opuszki węchowej (Walczak i wsp. 2004). Podobną ukierunkowaną migrację endogennych progenitorów neuralnych do sektora CA1 opisano w hipokampie szczura po niedokrwieniu (Nakatomi i wsp. 2002).

Wpływ czasu pomiędzy uszkodzeniem a transplantacją na przeżycie, migrację i integrację KM z tkanką biorcy

(Sarnowska, Jurga i wsp. 2009)

Poza wpływem środowiska i histologicznej topografii miejsca przeszczepu, innym istotnym czynnikiem warunkującym skuteczną migrację i różnicowanie komórek terapeutycznych wydaje się sam moment ich dostarczenia do organizmu gospodarza. Podanie KM na świeżo pozyskane, uszkodzone stresem izolacyjnym skrawki hipokampa (DIV0), może odwzorowywać sytuację przeszczepu w ostrej fazie uszkodzenia OUN. Warunki przeszczepu KM na skrawki hodowane przez siedem dni (DIV7), gdy tkanka biorcy była metabolicznie bardziej stabilna i przeszła okres pourazowej intensywnej przebudowy (Sarnowska i wsp. 2002), przypominały próbę leczenia przewlekłych stanów neurodegeneracyjnych. W naszych doświadczeniach skuteczna migracja była charakterystyczna dla komórek wysiewanych na świeżo otrzymane skrawki hipokampa (DIV0). Natomiast morfologiczne i immunocytochemiczne cechy zaawansowanego różnicowania neuronów obserwowano wyłącznie w doświadczeniach dotyczących przeszczepów na hodowle skrawków DIV7. Porównując z naszymi poprzednimi danymi (Jurga i wsp. 2006b), komórki te różnicowały się w ciągu kolejnych 7 dni wspólnej hodowli około 2 razy szybciej niż wysiane w DIV0. Oprócz ekspresji typowych markerów dla komórek neuronalnych, stwierdzono w nich również ekspresję receptora GluR 1-3. Ta obserwacja może wskazywać na pewną funkcjonalną dojrzałość nabytą przez przeszczepione komórki, które wykazywały gotowość do przyjmowania i prezentacji sygnałów pobudzających.

Jednym z ciekawszych wyników w naszym badaniu było wykazanie zahamowania immunoreaktywności GFAP po transplantacji komórek, obserwowane zarówno w tkance gospodarza, jak i w różnicujących się przeszczepionych komórkach. Wpływ komórek macierzystych/progenitorowych na zahamowanie proliferacji astrogleju był najbardziej widoczny po ich transplantacji w postaci neurosfer w regionie CA. Podobne obserwacje zostały opisane wcześniej przez Jurgę (Jurga i wsp. 2006) w hodowli *in vitro* oraz grupę Shen'a (Shen i wsp. 2007) w badaniach *in vivo*, gdzie zaobserwowano zmniejszenie grubości blizny glejowej wokół ogniska niedokrwiennego w rdzeniu kręgowym u szczurów po podaniu BM-MS. Powyższe wyniki sugerują, że KM po transplantacji hamują miejscowo tworzenie się blizn glejowych w uszkodzonej tkance OUN. Ta obserwacja wydaje się szczególnie istotna, ponieważ nadmierna astroglioza występuje w różnych zaburzeniach

neuropatologicznych i uważa się, że stanowi ona przeszkodę dla przywrócenia prawidłowej regeneracji uszkodzonych włókien nerwowych. Wyjaśnienia tego mechanizmu działania KM upatruje się w ich parakrynnych właściwościach adjuwantowych.

Równolegle z opisaną zdolnością HUCB-NSC do supresji miejscowej astrocytozy, obserwowano aktywację endogennej neurogenezy wokół przeszczepu. Ta obserwacja była zgodna z wcześniejszymi badaniami *in vivo* przeprowadzonymi przez inne grupy (Neuhoff i wsp. 2007, Taguchi i wsp. 2004) wykazującymi, że podanie komórek macierzystych pochodzących z krwi pępowinowej może stymulować endogenną neurogenezę u zwierząt, najprawdopodobniej również w mechanizmie parakrynnym.

Wpływ wzajemnych oddziaływań pomiędzy przeszczepionymi KM a tkanką biorcy (Sarnowska, Braun i wsp. 2009)

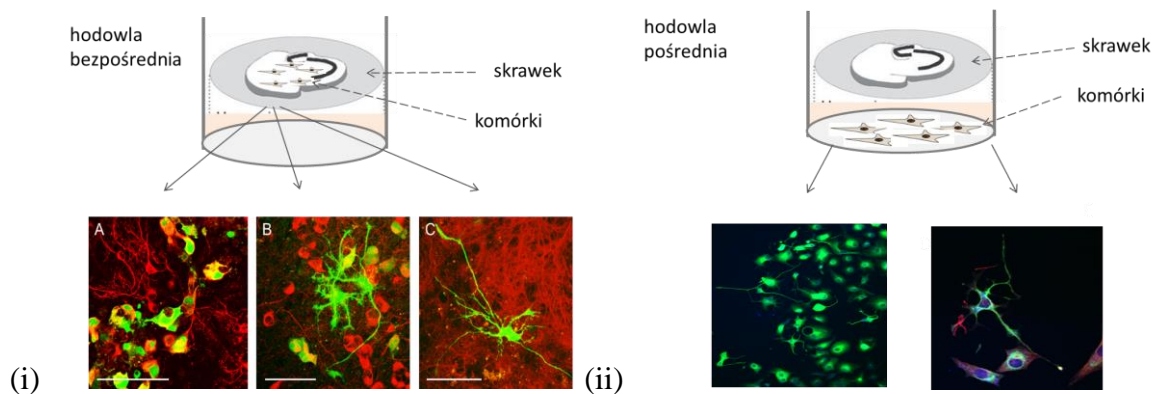
Wiele badań eksperymentalnych, w tym również nasze, sugeruje, że komórki macierzyste wytwarzają czynniki wzrostu i cytokiny zdolne do stymulacji endogennych mechanizmów naprawczych i dzięki temu prowadzą do poprawy deficytów funkcjonalnych (Dempsey i Kalluri, 2007; Liu i wsp., 2006; Zhang i wsp., 2004, Gornicka i wsp. 2011). Przeszczepione komórki nie tylko wpływają bezpośrednio na uszkodzoną tkankę gospodarza, ale także uczestniczą w modulacji wielu procesów ogólnoustrojowych. Analiza tych interakcji w eksperymentach *in vivo* jest często zakłócana poprzez współistniejące procesy zapalne, głównie wywołane nietolerancją immunologiczną gospodarza na ludzki ksenoprzeszczep komórkowy (Kozłowska i wsp., 2007a). Co więcej, immunologiczne odrzucenie jest szczególnie silnie zaznaczone, gdy przeszczepione komórki są podawane śródmiąższowo do OUN (Buhemann i wsp., 2006).

Zatem, kolejnym celem moich badań było ustalenie, czy działanie neuroregeneracyjne KM jest ściśle związane z ich zdolnością do odbudowy zniszczonego narządu i zależne jest od bezpośredniego kontaktu pomiędzy przeszczepianymi komórkami, a uszkodzoną tkanką. Ma to istotny wpływ na przyszłe decyzje kliniczne dotyczące drogi podawania MSC. Aby uniknąć wpływu procesów związanych z systemową odpowiedzią immunologiczną występującą po transplantacji *in vivo*, do badania tej zależności wykorzystaliśmy opisany wcześniej model *in vitro* organotypowej hodowli skrawków hipokampa szczura (OHC). W celu odtworzenia *in vitro* warunków naśladujących uraz niedokrwienny, skrawki OHC poddawano czasowemu ograniczeniu dopływu głównych substratów metabolicznych - tlenu i

glukozy (OGD). Możliwe bezpośrednie lub pośrednie działanie neuroprotekcyjne MSC oceniano po 24-godzinnej reperfuzji skrawków w dwóch układach eksperymentalnych:

(i) po transplantacji komórek podawanych bezpośrednio na skrawki (tzw. hodowla bezpośrednia)

(ii) we współhodowli komórek ze skrawkami hipokampa bez możliwości bezpośredniego kontaktu między nimi, (tzw. hodowla pośrednia)



Panel lewy: Schemat przedstawiający model hodowli bezpośredniej. W tym modelu KM transplantowane są na powierzchnię skrawka hipokampa. Na zielono wyznakowano CMFDA (5-chloromethylfluorescein diacetate) komórki HUCB-NSC, na czerwono wybarwione są komórki hipokampa szczura (A, B – β tubulina III; C- TUJ1). Panel prawy: Schemat przedstawiający model hodowli pośredniej. W tym modelu KM hodowane są na szalce, pod skrawkiem, w wspólnej pożywce hodowlanej.

Ocena po tak krótkim czasie od uszkodzenia potencjalnie wykluczała mechanizmy związane z zaawansowanym różnicowaniem i repopulacją uszkodzonej tkanki poprzez kontakt lub parakrynnny wpływ MSC.

Do badań użyliśmy BMSC izolowanych ze szpiku szczura (przeszczep allogeniczny). Komórki hodowano w standardowych warunkach (BMSC-basal) lub w pożywce pozbawionej surowicy (BMSC- SD). Hodowla w pożywce pozbawionej surowicy umożliwiła uzyskanie populacji komórek bogatszej w progenitory neuralne, ekspresjonujące nestynę i GFAP (Sauerzweig i wsp., 2009), w odróżnieniu od nieodróżnicowanej, heterogennej populacji komórek hodowanych w pożywce zawierającej surowicę. W celach porównawczych transplantowano również świeżo izolowaną populację komórek z kory mózgu (primary cortical cell culture) bogatą w progenitory neuralne (PrimC).

W obu modelach hodowli (bezpośrednim i pośrednim) MSC indukowały porównywalną i znaczącą neuroprotekcję skrawków hipokampa poddanych OGD. Efekt uszkodzenia

uwidoczono analizując zatrzymywanie jodku propidyny przez komórki rejonu CA1 oraz zmniejszenie liczby neuronów piramidowych w CA1, wykazujących dodatkowo zwiększoną i rozprzestrzenioną obecność cytochromu c w cytoplazmie oraz aktywację kaspazy 3.

Efekt ochronny komórek był wyraźnie większy w badaniach z zastosowaniem populacji BMSC-SD zawierającej progenitory neuralne.

Porównując działanie neuroprotekcjne MSC w obu układach eksperymentalnych doszliśmy do wniosku, że neuroprotekcjny efekt MSC obserwowany w krótkim czasie po niedokrwieniu (24 h) nie zależy od bezpośredniego kontaktu komórka-komórka. Ponadto potwierdzono poprzednie wyniki, wykazujące, że oddziaływania pomiędzy przeszczepionymi komórkami, a uszkodzoną tkanką mają charakter bilateralny. Skrawki OHC poddane uszkodzeniu (OGD) stymulowały wyraźnie współhodowane z nimi BMSC-SD oraz PrimC do wyższej ekspresji neurotroficznycy czynników wzrostowych bFGF i NGF oraz do zwiększonego różnicowania pro-neuralnego, czego nie obserwowano w takim stopniu we współhodowlach ze skrawkami nieuszkodzonymi.

Kolejna obserwacja dotyczyła różnic w migracji i różnicowaniu MSC w zależności od wielkości obecnej w nich subpopulacji komórek Nestyna/GFAP pozytywnych. MSC wysiane na uszkodzoną tkankę hipokampa przez kolejne 7 dni migrowały w głąb skrawka, ale migracja wyżej zróżnicowanych BMSC-basal pozostawała mniejsza, a ich przeżycie słabsze. BMSC-SD migrowały przez całą grubość skrawka, a ich przeżycie było wyższe. BMSC-basal po zakończeniu migracji zachowały okrągłą morfologię komórek nisko-zróżnicowanych, natomiast BMSC-SD różnicowały się w kierunku neuronalnym i glejowym wykazując typową wielobiegunową morfologię. W kontrolnej populacji PrimC, w obecności uszkodzonej tkanki obserwowano również podobną zmianę morfologii komórek i różnicowanie z form progenitorowych w dojrzałe neurony. Obecność uszkodzonej tkanki indukowała znaczny wzrost długości obecnych dendrytów i sprzyjała powstawaniu nowych wypustek.

Podsumowując, wyniki naszych badań wykazały, że MSC posiadają silne działanie neuroprotekcjne związane głównie z działaniem adjuwantowym, nie wymagającym bezpośredniego kontaktu z uszkodzoną tkanką. Mechanizm neuroprotekcjny wywoływany 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). Ponadto

przedstawiony efekt terapeutyczny wydaje się nie być warunkowany stopniem zróżnicowania neuronalnego podawanych komórek terapeutycznych. Takie obserwacje mogą mieć ważne implikacje dla praktyki klinicznej, sugerując możliwość udanej terapii komórkowej po transplatacji KM do przestrzeni płynowych (np. dokomorowo, intratekalnie) w pewnym oddaleniu od oczekiwanego celu terapeutycznego.

Jednocześnie ponownie udowodniono, 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 ich hodowli, co było tematem oddzielnych projektów z moim udziałem nie wchodzących jednak w zakres przedstawianego tutaj opracowania. (Drela i wsp. 2016).

Wpływ mikrośrodowiska na ukierunkowanie różnicowania i właściwości adjuwantowe przeszczepianych KM

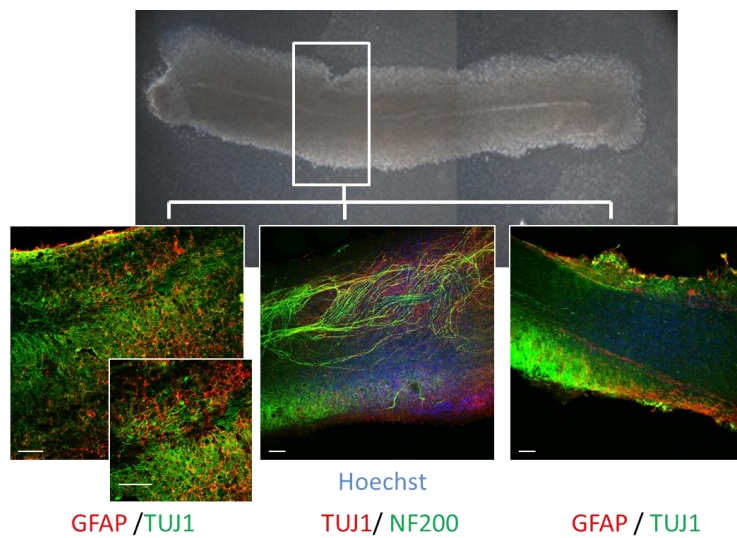
(Sypecka i wsp. 2015, Sypecka, Sarnowska 2013, Sarnowska i wsp. 2013)/

W ośrodkowym układzie nerwowym osoby dorosłej istnieje naturalny rezerwuuar progenitorów neuralnych zasiedlających strefę przykomorową (SVZ) (Gonzalez-Perez i wsp. 2011, Nait-Oumesmar i wsp. 2011) i wnękę zakrętu zębatego hipokampa (DG). Rezerwuuar ten mógłby zostać zmobilizowany do celów odbudowy uszkodzonej tkanki. Jednak los zarówno rekrutowanych prekursorów endogennych, jak i przeszczepionych komórek może być znacząco zmieniany przez lokalne mikrośrodowisko tkankowe, kształtujące nisze komórkowe, w tym przez: sąsiadujące komórki, białka macierzy zewnątrzkomórkowej, a także wydzielane cząsteczki rozpuszczalne (czynniki troficzne, cytokiny i morfogeny) (Markiewicz i wsp. 2011, Kim i wsp. 2012) oraz ich zmiany zależne od toczącego się procesu chorobowego. Podczas gdy promowanie neurogenezy jest zwykle wysoce pożądane, stosunkowa łatwość różnicowania się w astrocyty może okazać się poważną przeszkodą regeneracyjną, prowadząc do tworzenia blizn glijowych utrudniających migrację komórek, dostarczanie czynników przeciwzapalnych i troficznych. Mikrośrodowisko znacząco wpływa nie tylko na różnicowanie badanych komórek, ale również na ich aktywność parakrynną, przyczyniając się do inicjowania procesów neurogennych, neuroprotektoryjnych, a także, co niezwykle istotne z punktu widzenia terapii komórkowej, do modulowania systemowych reakcji immunologicznych.

Nasze obserwacje wraz z raportami pochodzącymi z innych laboratoriów doprowadziły m.in. do podniesienia kwestii możliwych różnic molekularnych pomiędzy tkanką nerwową

pochodzącą z różnych regionów OUN, które to różnice mogą mieć wpływ na losy zarówno endogennych progenitorów neuralnych, jak i transplantowanych, egzogennych KM.

W tym celu postanowiono stworzyć model organotypowej hodowli skrawków podłużnych rdzenia kręgowego (SSC), adekwatny do modelu organotypowych hodowli hipokampa. Najważniejszą zaletą prezentowanego modelu jest zachowanie wewnętrznego odcinka włókien rdzenia kręgowego i jego biegunowości. Model umożliwia względnie łatwą wizualizację procesów zachodzących podczas wzrostu aksonalnego, regeneracji, tworzenia synaps i mielinizacji podczas hodowli *in vitro* przez okres do 4-5 tygodni po wyizolowaniu skrawków (Sypecka i wsp. 2015). Dotychczasowo stosowane hodowle poprzeczne skrawków rdzenia uniemożliwiały podłużny wzrost aksonów, podstawę procesów patologicznych zachodzących w wielu chorobach rdzenia kręgowego.



Schemat przedstawia model organotypowej hodowli skrawków podłużnych rdzenia kręgowego.

W oparciu o powyższe modele organotypowe (skrawków hipokampa – obszaru o przeważających sygnałach neurogennych i skrawków rdzenia - obszaru o potencjalnie dominującym sygnale gliogennym) przeprowadzono analizę molekularną wybranych czynników regulujących kluczowe procesy komórkowe. Dodatkowo zbadano zdolność tych dwóch mikrośrodków do promowania różnicowania w kierunku astrocytów.

Analiza molekularna wykazała znaczne różnice w poziomach mRNA głównych czynników regulujących biologię komórki. Ekspresja dziewięciu badanych czynników (spośród piętnastu) okazała się wyższa w obszarze hipokampa w porównaniu ze skrawkami rdzenia kręgowego, dwóch obniżona, a tylko czterech podobna. Do czynników silnie eksprymowanych w hipokampie należały m.in. czynniki wywierające efekty neurotroficzne:

neurotrofiny NGF i BDNF, a także CNTF i GDNF, odgrywające rolę w rekrutacji nowych neuronów (Harvey i wsp. 2012), a także czynniki z rodziny GMF i FGF-2 zaangażowane w regulację genów odpowiedzialnych za proliferację, migrację, różnicowanie i przeżycie komórek, neurogenezę i wzrost aksonów (Fortin i wsp. 2005, Reus i wsp. 2003). Odkrycia te potwierdzają jednoznacznie, że lokalne mikrośrodowisko tkankowe w obrębie układu nerwowego jest znacząco heterogenne.

Dodatkowo oceniano również zdolność tych dwóch mikrośrodków do promowania astrocytarnego różnicowania progenitorów oligodendralnych (OPC). Podczas gdy w pierwotnej hodowli OPC komórki GFAP-pozytywne stanowiły bardzo małą populację, w doświadczeniach kontrolnych ich ilość znacznie wzrosła, zarówno podczas hodowli w pożywce stale kondycjonowanej, jak i w obecności hodowli skrawków hipokampa lub rdzenia kręgowego. Obserwowana podatność na wpływ lokalnych sygnałów pozakomórkowych może skutecznie przyczynić się do stwierdzonego powstawania blizn glejowych.

Specyfika różnych regionów OUN, wykazana w przedstawionym badaniu, może znacznie modyfikować los, migrację i różnicowanie komórek progenitorowych, co należy wziąć pod uwagę w planowanych terapiach komórkowych (Sypecka, Sarnowska 2013). W celu poszerzenia poprzednich obserwacji przeprowadzono współhodowlę bezpośrednią i pośrednią (wg modelu opisanego wcześniej) OPC ze skrawkami rdzenia kręgowego lub hipokampa. Zaobserwowano, że zarówno bezpośrednio, jak i pośrednio współhodowle ze skrawkami hipokampa sprzyjały dojrzewaniu znaczącej części OPC w kierunku neuronalnym (komórki stawały się TUJ1-pozytywne) i przyspieszeniu dojrzewania oligodendrogleju. Już po 7 dniach hodowli można było obserwować znaczną liczbę wielowypustkowych oligodendrocytów GalC pozytywnych. Odwrotnie, efekt neurogeny był znacznie mniej wyraźny w hodowlach SCC-OPCs, a różnicowanie komórek przebiegało znacznie wolniej, w porównaniu z hodowlami prowadzonymi w obecności skrawków hipokampa. W hodowli komórkowej przeważały komórki progenitorowe (NG2+) i niedojrzałe (O4+) komórki oligodendrogleju.

Podsumowując, przedstawione 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 .

Ostatnie badania wskazują, że różnicowanie KM w dojrzałe tkanki zależy nie tylko od składu komórkowego, ale również od fizykochemicznych właściwości środowiska t.j.: struktura,

elastyczność i skład. Parametry te oddziałując poprzez mechanoczułe receptory, zamieniające bodziec fizyczny na sygnał biochemiczny, modulują rozwój komórki wpływając na drogę różnicowania w określonym kierunku (Reilly GC i wsp. 2010). Wiedza dotycząca wpływu bodźców zewnętrznych na los komórek może umożliwić regulowanie poprzez kształty, topografię bądź strukturę chemiczną środowiska (szkielety, związki adhezyjne, domeny biofunkcjonalne) różnicowanie tych komórek. Zastosowanie struktur 3D w transplantacji KM wydaje się być tym bardziej zasadne, że przeszczepiane egzogennie komórki, pomimo migracji do miejsca urazu, przeżywają krótko i są zbyt nieliczne, aby można było brać pod uwagę ich zdolności reparacyjne (Kozłowska i wsp. 2007). Oprócz wpływu na różnicowanie komórek, na ich zdolność do tworzenia połączeń, zadaniem szkieletów jest również ochrona przeszczepu przed napływającymi komórkami układu odpornościowego (Hejcl i wsp. 2008, Potter i wsp. 2008).

Klasyczne szkielety 3D można podzielić na dwie główne grupy: typu wspierającego, z komórkami zlokalizowanymi głównie na ich powierzchni i typu integracyjnego (o charakterze gąbki lub hydrożelu) z komórkami penetrującymi do rdzenia rusztowania (Jurga i wsp. 2009). Pierwszy rodzaj szkieletów wykazuje dużą zdolność do tworzenia macierzy dla nasadzonych komórek, natomiast typ integracyjny stanowi lepszą barierę fizyczną, chroniącą komórki przed infiltracją komponentów układu odpornościowego oraz tworzy dzięki topografii model niszy komórkowej.

Celem naszych kolejnych badań było dobranie optymalnego, bioaktywnego szkieletu łączącego cechy obu rusztowań. Po wyborze szkieletu analizowaliśmy jego wpływ na przeżywalność komórek, podjęcie dalszych decyzji migracyjnych i różnicujących oraz wpływ na efekt neuroprotekcyny wywołany przez zasiedlające szkielet MSC izolowane z galarety Whartona (WJ-MSC). Badania przeprowadzono na dwóch biodegradowalnych szkieletach o strukturze porowatej: żelatynowym i dekstranowym, pokrytych lamininą w celu biofunkcjonalizacji ich powierzchni. Dobrano szkielety zbudowane z porów o różnej wielkości. W badaniach *in vitro* lepsze wyniki uzyskano stosując szkielety żelatynowe. Przeżycie komórek na tych szkieletach wynosiło około 70-80%. Komórki gromadziły się w wewnętrznej przestrzeni rusztowania i wykazywały ekspresję markera proliferacji Ki67. W środku rusztowania, w małych porach (o średnicy < 80 mikronów) przypominających nisze komórkowe, MSC tworzyły agregaty, ekspresjonując typowe markery niedojrzałych neuroblastów t.j. nestyna czy GFAP. W porach o średnicy 80-120 mikronów obserwowano różnicowanie się komórek, zmianę ich morfologii na dojrzałą i ekspresję markerów głównie

neuralnych - wzrost sieci neuralnych (Sarnowska i wsp. 2013). Przez duże pory (> 120 mikronów) dochodziło do wymiany medium i gazów (Jurga i wsp. 2011).

Tak zasiedlone szkielety były przeszczepiane *ex vivo* na hodowle organotypowe skrawków hipokampa szczura (nieuszkodzone oraz poddane OGD) oraz *in vivo* do prądkowia szczurów stada Wistar, zdrowych lub poddanych ogniskowemu uszkodzeniu mózgu z zastosowaniem ouabainy. W celu porównania do klasycznego przeszczepu, podawano również WJ-MSC w postaci zawiesiny.

Stworzenie dla komórek podłoża do proliferacji i różnicowania się oraz zapewnienie bariery dla układu immunologicznego wzmocniły efekt neuroprotekcyny i przeciwzapalny WJ-MSC, co silnie korelowało z lepszym przeżyciem przeszczepu. Szkielety zasiedlone przez MSC wywoływały mniejszą reakcję zapalną niż wszczepiane niezasiedlone szkielety. Obserwowano mniejszą aktywność mikrogleju, zahamowanie tworzenia blizny wokół przeszczepu, a w tkance biorcy niższy poziom IL-6. Ponadto szkielety obsadzone komórkami silnie aktywowały w otaczającej tkance metaloproteinazy 2 i 9, ułatwiając ich biodegradację i zwiększając zdolność do przebudowy tkanki. Obserwowano silne obustronne oddziaływanie nasadzonych komórek i szkieletu.

Wpływ naturalnej selekcji i zmian fenotypu komórek MSC w czasie hodowli na stopień ich zróżnicowania i właściwości regeneracyjne

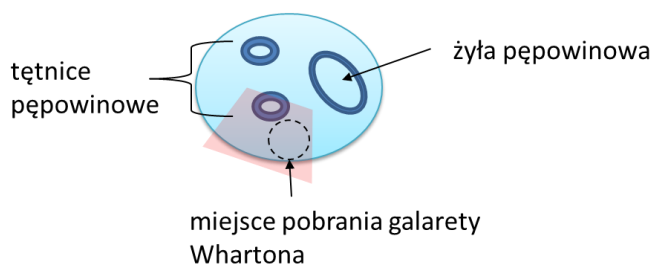
(Dabrowska i wsp. 2017)

Pomimo wielkich nadziei i 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 transplantowanych MSC w odbudowie uszkodzonego narządu. Do tych pozytywnych przypadków należą choroby hematologiczne, uszkodzenia rogówki, złamania kości i uszkodzenia chrząstek, choroby i urazy skóry. Przy terapiach opartych na komórkach mezenchymalnych w innych narządach, w tym OUN, wykorzystuje się głównie działanie parakryne MSC, wspomagające endogenne mechanizmy regeneracyjne danego narządu lub tkanki.

Niespójności w wynikach końcowych publikowanych badań klinicznych z zastosowaniem MSC wynikać więc mogą m.in. z podawania komórek o różnych zdolnościach adjuwantowych. Analizując opublikowane protokoły badań klinicznych, stwierdziłam, że

niektórzy pacjenci otrzymywali w pierwszych podaniach świeżo wyizolowane MSC, a w kolejnych podaniach komórki namnażane *in vitro*. Niektórzy badacze stosowali w terapii heterogenną populację komórek, np. jednojądrzastych z krwi obwodowej (Barbosa da Fonseca i wsp. 2010, Angulski i wsp. 2017, Fernandes i wsp. 2012) lub mezenchymalną frakcję stromalną (Shen i wsp. 2007). Inni wykorzystywali komórki hodowane *in vitro*, wyselekcjonowane, choć wciąż niejednorodne, określone różnym stopniem jednostek tworzących kolonię (CFU - colony-forming unit). Niestety najczęściej ośrodki kliniczne, nieświadome różnic pomiędzy takimi populacjami, podawały je naprzemiennie lub losowo.

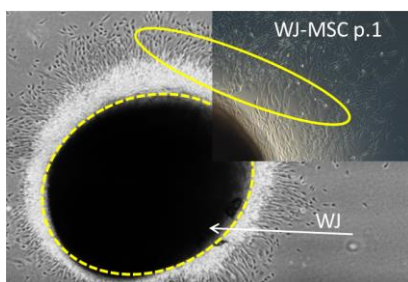
Mając nadzieję, że właściwa standaryzacja sposobu hodowli może zwiększyć długość przeżycia przeszczepu, zdolności protekcyjne komórek oraz bazując na poprzednich wynikach badań, nasz ostatni projekt skoncentrowany był na analizie zależności między stopniem zróżnicowania MSC, a ich właściwościami sekrecyjnymi/immunomodulującymi. Chcieliśmy ponadto ocenić, czy właściwości neuroprotekcyjne są silniej wywoływane przez świeżo izolowaną, heterogenną populację komórek, czy też przez prowadzone w sposób



Schemat przedstawiający przekrój przez pępowinę ludzką. Na jaśniejszym tle przedstawiono miejsce pobrania wycinka galarety Whartona.

naturalnego szkieletu 3D zasiedlonego komórkami), (ii) heterogenną niezróżnicowaną populację WJ-MSC krótko hodowaną (1 pasaż), oraz (iii) częściowo zróżnicowaną, bardziej homogeną hodowlę z pasażu 4.

Wszystkie trzy populacje zostały scharakteryzowane pod kątem obecności markerów



Zdjęcie przedstawia fragment galarety Whartona (WJ) oraz pierwszą kohortę wymigrowujących komórek (WJ-MSC p.1)

występujących w komórkach pochodzenia mezenchymalnego, markerów neuralnych oraz panelu wydzielanych cytokin. Obecność typowych dla komórek mezenchymalnych białek szkieletowych i antygenów powierzchniowych występowała we wszystkich

ukierunkowany hodowle komórek macierzystych/progenitorowych.

Podczas doświadczeń zastosowano trzy różne populacje ludzkich mezenchymalnych komórek wyizolowanych ze sznura pępowiny:

(i) komórki zasiedlające stromę pępowiny, analizowane w postaci fragmentu pępowiny (WJ- rodzaj

populacjach, lecz z tendencją do zanikania w trakcie hodowli. Odwrotnie sytuacja wyglądała z ekspresją markerów neuralnych, które były całkowicie nieobecne w tkance pępowiny. Po odmigrowaniu ze stromy pępowiny na powierzchnię hodowlaną, komórki rozpoczynały spontaniczne różnicowanie w kierunku neuralnym, coraz wyraźniejsze wraz z czasem trwania hodowli.

W kolejnym etapie doświadczeń komórki były współhodowane z nieuszkodzonymi lub poddanymi deprywacji tlenu i glukozy skrawkami hipokampa szczura. Oceniano wpływ współhodowli na rozległość uszkodzenia tkanki, analizowano stopień zróżnicowania WJ-MSc pod wpływem tkanki nerwowej oraz badano potencjalne mechanizmy działania neuroprotekcynowego WJ-MSc. Najsilniejszy efekt ochronny zaobserwowano przy współhodowli z fragmentami pępowiny zawierającymi heterogenną, niezróżnicowaną populację komórek, oraz z pierwszą kohortą komórek migrujących z tych fragmentów (pasaż 1). Dłuższa hodowla MSc pochodzących z WJ spowodowała obniżenie właściwości protekcyjnych i zasadnicze zmiany ich właściwości parakrynych. Populacja komórek bogata w progenitory neuralne wydzielala więcej czynników neurotroficznycch lecz mniej immunomodulacyjnych niż niejednorodna i mniej zróżnicowana populacja z pierwszego pasażu hodowli (WJ-MSc1). Jednocześnie bliska obecność tkanki nerwowej, a szczególnie po przebytych incydencie OGD, przyspieszyła różnicowanie mezenchymalnych komórek macierzystycch sznura pępowinowego w kierunku neuralnym.

Badania te wykazały, że WJ-MSc w zależności od czasu prowadzenia hodowli *in vitro* wydzielają czynniki w różnym stopniu wpływające na plastyczność macierzy zewnątrzkomórkowej, mają znacząco inne właściwości naczyniotwórcze, neuroprotekcynowe i przeciwzapalne. Opisane różnice pomiędzy pierwszym i czwartym pasażem hodowlanym są wystarczająco istotne, aby wywierać wyraźny wpływ na zdolności terapeutyczne komórek i poprawę kliniczną po przeszczepie.

Podsumowując, nasze badania wskazują wyraźnie na potencjalne zdolności KM do odbudowy uszkodzonych sieci neuralnych. Niestety, o ile w środowisku *ex vivo* możemy te oddziaływania obserwować i częściowo kontrolować, o tyle *in vivo* nadal nie dysponujemy takimi możliwościami. Dzieje się tak m.in. ze względu na brak zaaprobowanych przez FDA zaawansowanych technik przyżyciowego znakowania i obserwacji komórek podawanych pacjentom przez dłuższy czas po przeszczepie. Pozbawia to nas możliwości uzyskania bezpośrednich dowodów na rekonstrukcyjne działanie terapii komórkowej, niezbędnych do funkcjonalnego odtworzenia zniszczonej sieci neuronalnej u ludzi.

Wielu neurologów zadaje pytanie czego więc i w jakim mechanizmie możemy oczekiwać od obecnie stosowanej terapii komórkowej w chorobach OUN. Działania te, bazujące wprawdzie na wynikach wielu modelowych badań przedklinicznych, potencjalnie mogą być wielokierunkowe, lecz obecnie jedynie w niewielkim stopniu potwierdzone i gotowe do standardowej translacji klinicznej. Dzięki potwierdzonym właściwościom parakrynnym i immunomodulacyjnym KM można liczyć na polepszenie funkcji uszkodzonego narządu w mechanizmie redukcji odczynu zapalnego, stymulacji angiogenezy, inhibicji tworzenia blizny glejowej oraz pośredniej indukcji endogennej neurogenezy. Dzięki jednoczesnej aktywacji wielu ścieżek sygnałowych może dojść do poprawy struktury i funkcji metabolicznych uszkodzonych komórek nerwowych lub nawet, ale ciągle teoretycznie, do ich wymiany.

O wiele bardziej potwierdzonym i zaawansowanym praktycznie kierunkiem terapeutycznym z wykorzystaniem KM są parakrynnie i immunomodulujące działania MSC. Duży potencjał tych komórek do suplementacji parakrynnnej można stosunkowo łatwo wykorzystywać w chorobach systemowych lub nawet genetycznych posiadających wyraźną komponentę zapalną i immunologiczną. W takich układowych jednostkach chorobowych z wyraźną komponentą zapalną powinno się stosować podania systemowe komórek MSC charakteryzujących się sprawdzonym profilem wydzielniczym o określonych i potwierdzonych w badaniach przedklinicznych właściwościach pobudzających procesy naprawcze. Często są to komórki regeneracyjne o charakterze przeciwnym naszym intuicyjnym oczekiwaniom. Np. świeżo izolowana, heterogenna populacja komórek jednojądrzastych, pochodząca z krwi pępowinowej (HUC-MNC) lub z tkanki tłuszczowej (ADRC), może okazać się bardziej aktywną w swoich właściwościach regeneracyjnych niż wyselekcjonowana i ukierunkowana *in vitro* hodowla o dużym stopniu jednorodności.

Jednak taki mechanizm regeneracyjny nie zawsze sprawdza się w chorobach o silnym uwarunkowaniu monogenetycznym. W takich jednostkach chorobowych o charakterze postępującym i z nieodwracalnym uszkodzeniem konkretnych populacji komórek CUN należy wykorzystywać raczej komórki macierzyste lub progenitorowe o potwierdzonym i szczególnie zaawansowanym potencjale do różnicowania w kierunku neuralnym. W przypadku wrodzonych chorób neurodegeneracyjnych o podłożu mono- lub poli-genowym, podejmowana terapia powinna opierać się głównie na stosowaniu komórek allogenicznych, pozbawionych genetycznego piętna chorobowego. Jednakże, w niektórych chorobach o podłożu genetycznym pacjenci reagują pozytywnie na autologiczną terapię komórkową,

działającą tutaj głównie poprzez supresję towarzyszącej chorobie komponenty zapalnej i immunologicznej, co może prowadzić do wyraźnej stabilizacji progresji objawów choroby.

Dobrym przykładem może być terapia komórkowa w dystrofii mięśniowej (MD), w której dochodzi do postępującego zaniku mięśni i towarzyszącego mu stanu zapalnego zaostrzającego postępujące uszkodzenie jednostki nerwowo-mięśniowej w MD. Stosowane obecnie podawanie autologicznych komórek mezenchymalnych spowalnia postęp choroby poprzez dostarczenie neurotrofin i immunomodulatorów hamujących składową zapalną tego schorzenia. Przyczynowa terapia, czyli odnowa uszkodzonych włókien mięśniowych poprzez suplementację zdrowymi mioblastami, byłaby możliwa jedynie w wyniku allogenicznego przeszczepu miogennych KM.

Wśród nielicznych doniesień potwierdzających regeneracyjne działanie KM istotne są również badania dotyczące zastosowania linii HuCN-SC (unieśmiertelnionych komórek macierzystych izolowanych z mózgu płodów) w różnych jednostkach chorób neurodegeneracyjnych (Levi i wsp. 2017). Po miejscowej transplantacji tych komórek opisano ich różnicowanie do oligodendrocytów i interneuronów oraz wbudowanie zastępcze do obszarów uszkodzeń w następujących jednostkach chorobowych: spichrzeniowych chorobach lizosomalnych (Ceroidolipofuscynozie neuronalnej), w leukodystrofiach (Chorobie Pelizaeusa-Merzbachera), w urazach rdzenia oraz w zwyrodnieniu plamki związanym z wiekiem (AMD- aged-related macular degeneration). Również, zgodnie z opisaną powyżej hipotezą o pluripotencjalności komórek macierzystych występujących w subfrakcjach MSC (Wakao i wsp. 2012; Qi i wsp. 2011), międzynarodowa grupa badawcza (Uchida i wsp. 2017) wykazała po raz pierwszy odbudowę morfologiczną i funkcjonalną dróg piramidowych uszkodzonych w wyniku jednostronnego ogniskowego niedokrwienia mózgu po podaniu wyselekcjonowanej subpopulacji MSC tzw. „Muse” (Multilineage- differentiating stress-enduring cells) (Uchida i wsp. 2017). Jest to najbliższy klinice eksperymentalny dowód funkcjonalnej komórkowej terapii rekonstrukcyjnej przy zastosowaniu pluripotencjalnej subpopulacji ludzkich MSC (muse) (Kuroda i wsp. 2014).

W świetle tych badań, wydaje się całkowicie zasadne dalsze badanie czynników, które mogłyby wzmocnić właściwości regeneracyjne, a nawet neurozastępcze komórek MSC poprzez odbudowę sieci neuralnych, a także umożliwić lepszą kontrolę nad losem tych komórek po przeszczepie.

Literatura:

1. Angulski AB, Capriglione LG, Batista M, Marcon BH, Senegaglia AC, Stimamiglio MA, Correa A. The Protein Content of Extracellular Vesicles Derived from Expanded Human Umbilical Cord Blood-Derived CD133(+) and Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Partially Explains Why both Sources are Advantageous for Regenerative Medicine. *Stem Cell Rev.* 2017 Apr;13(2):244-257
2. Barbosa da Fonseca LM, Gutfilem B, Rosado de Castro P H, Battistella V, Goldenberg R C, Kasai-Brunswick T, Chagas C L, Wajnberg E, Maiolino A, Salles Xavier S, Andre C, Mendez-Otero R, de Freitas G R (2010) Migration and homing of bone-marrow mononuclear cells in chronic ischemic stroke after intra-arterial injection. *Exp Neurol.* 221(1):122-128.
3. Buhnemann C., Scholz A., Bernreuther C., Malik C.Y., Braun H., Schachner M., Reymann K.G., Dihne M. Neuronal differentiation of transplanted embryonic stem cell-derived precursors in stroke lesions of adult rats *Brain*, 129 (2006), pp. 3238-3248
4. Buzanska L., Jurga M., Stachowiak E.K., Stachowiak M.K., Domanska-Janik K. Neural stem-like cell line derived from a nonhematopoietic population of human umbilical cord blood. *Stem Cells Dev.* 2006, 15(3), 391-406.
5. Buzanska L., Machaj E.K., Zablocka B., Pojda Z., Domanska-Janik K. Human cord blood-derived cells attain neuronal and glial features in vitro. *J Cell Sci.* 2002, 115, 2131-8
6. Caplan A.I. Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name! *Stem Cells Transl Med.* 2017, 6(6), 1445-1451.
7. 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.
8. Dempsey, R.J., Kalluri, H.S. 2007. Ischemia-induced neurogenesis: role of growth factors. *Neurosurg. Clin. N. Am.* 18: 183–90
9. Drela K., Lech W., Figiel-Dabrowska A., Zychowicz M., Mikula M., Sarnowska A., Domanska-Janik K. Enhanced neuro-therapeutic potential of Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells culture. *Cytotherapy.* 2016, 18(4), 497-509.
10. Fernandes JF, Rocha V, Labopin M, Neven B, Moshous D, Gennery AR, Friedrich W, Porta F, Diaz de Heredia C, Wall D, Bertrand Y, Veys P, Slatter M, Schulz A, Chan KW, Grimley M, Ayas M, Gungor T, Ebell W, Bonfim C, Kalwak K, Taupin P, Blanche S, Gaspar HB, Landais P, Fischer A, Gluckman E, Cavazzana-Calvo M; Eurocord and Inborn Errors Working Party of European Group for Blood and Marrow Transplantation. Transplantation in patients with SCID: mismatched related stem cells or unrelated cord blood? *Blood.* 2012 Mar 22;119(12):2949-55.

11. Fortin D, Rom E, Sun H, Yayan A, Bansal R. Distinct fibroblast growth factor (FGF)/FGF receptor signaling pairs initiate diverse cellular responses in the oligodendrocyte lineage. *J Neurosci* 2005; 25: 7470-7479.
12. Gonzalez-Perez O, Alvarez-Buylla A. Oligodendrogenesis in the subventricular zone and the role of epidermal growth factor. *Brain Res Rev* 2011; 67: 147-156.
13. Gornicka-Pawlak el B, Janowski M, Habich A, Jablonska A, Drela K, Kozłowska H, Lukomska B, Sypecka J, Domanska-Janik K. Systemic treatment of focal brain injury in the rat by human umbilical cord blood cells being at different level of neural commitment. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2011;71(1):46-64
14. Harvey AR, Ooi JW, Rodger J. Neurotrophic factors and the regeneration of adult retinal ganglion cell axons. *Int Rev Neurobiol*. 2012;106:1-33.
15. Hejcl A, Lesný P, Prádný M, Michálek J, Jendelová P, Stulík J, Syková E. Biocompatible hydrogels in spinal cord injury repair. *Physiol Res*. 2008;57 Suppl 3:S121-32.
16. Jin K, M Minami, JQ Lan, XO Mao, S Bateau, RP Simon and DA Greenberg. (2001). Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:4710–4715.
17. Jurga M, Buzanska L, Malecki M, Habich A, Domanska-Janik K. Function of ID1 protein in human cord blood-derived neural stem-like cells. *J Neurosci Res*. 2006 Oct;84(5):993-1002.
18. Jurga M, Dainiak MB, Sarnowska A, Jablonska A, Tripathi A, Plieva FM, Savina IN, Strojek L, Jungvid H, Kumar A, Lukomska B, Domanska-Janik K, Forraz N, McGuckin CP. The performance of laminin-containing cryogel scaffolds in neural tissue regeneration. *Biomaterials*. 2011 May;32(13):3423-34.
19. Jurga M, I Markiewicz, A Sarnowska, A Habich, H Kozłowska, B Lukomska, L Buzanska and K Domanska-Janik. (2006). Neurogenic potential of human umbilical cord blood: neural-like stem cells depend on previous long-term culture conditions. *J Neurosci Res* 83:627–637. (b)
20. Jurga M, Lipkowski AW, Lukomska B, Buzanska L, Kurzepa K, Sobanski T, Habich A, Coecke S, Gajkowska B, Domanska-Janik K. Generation of functional neural artificial tissue from human umbilical cord blood stem cells. *Tissue Eng Part C Methods*. 2009 Sep;15(3):365-72.
21. Kim H, Cooke MJ, Shoichet MS. Creating permissive microenvironments for stem cell transplantation into the central nervous system. *Trends Biotechnol* 2012; 30: 55-63.
22. Kozłowska H., Jablonka J., Janowski M., Jurga M., Kossut M., Domańska-Janik K. Transplantation of a novel human cord blood-derived neural-like stem cell line in a rat model of cortical infarct. *Stem Cells Dev*. 2007, 16(3), 481-8.
23. Kuroda Y, Dezawa M. Mesenchymal stem cells and their subpopulation, pluripotent muse cells, in basic research and regenerative medicine. *Anat Rec (Hoboken)*. 2014 Jan;297(1):98-110.

24. Levi A.D., Okonkwo D.O., Park P., Jenkins A.L. 3rd, Kurpad S.N., Parr A.M., Ganju A., Aarabi B., Kim D., Casha S., Fehlings M.G., Harrop J.S., Anderson K.D., Gage A., Hsieh J., Huhn S., Curt A., Guzman R. Emerging Safety of Intramedullary Transplantation of Human Neural Stem Cells in Chronic Cervical and Thoracic Spinal Cord Injury. *Neurosurgery*. 2017, 24.
25. Liu Y., Dulchavsky D.S., Gao X., Kwon D., Chopp M., Dulchavsky S., Gautam S.C. Wound repair by bone marrow stromal cells through growth factor production *J. Surg. Res.*, 136 (2006), pp. 336-341
26. Markiewicz I, Sypecka J, Domanska-Janik K, Wyszomirski T, Lukomska B. Cellular environment directs differentiation of human umbilical cord blood-derived neural stem cells *in vitro*. *J Histochem Cytochem* 2011; 59: 289-301.
27. Nait-Oumesmar B, Picard-Riéra N, Kerninon C, Baron-Van Evercooren A. The role of SVZ-derived neural precursors in demyelinating diseases: from animal models to multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2008; 265: 26-31.
28. Nakatomi H, T Kuriu, S Okabe, S Yamamoto, O Hatano, N Kawahara, A Tamura, T Kirino and M Nakafuku. (2002). Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell* 110:429–441.
29. Neuhoff S, J Moers, M Rieks, T Grunwald, A Jensen, R Dermietzel and C Meier. (2007). Proliferation, differentiation, and cytokine secretion of human umbilical cord blood-derived mononuclear cells *in vitro*. *Exp Hematol* 35:1119–1131.
30. Neumann J., Gunzer M., Gutzeit H.O., Ullrich O., Reymann K.G., Dinkel K. Microglia provide neuroprotection after ischemia *FASEB J.*, 20 (2006), pp. 714-716
31. Potter W, Kalil RE, Kao WJ. Biomimetic material systems for neural progenitor cell-based therapy. *Front Biosci*. 2008 Jan 1;13:806-21.
32. Qi H, Yang YL, Xie HB, Zhou HX, Deng CY, Li FR. Teratoma derived from bone marrow mesenchymal stem cells in a diabetic microenvironment. *Pancreas*. 2011 Aug;40(6):981-3.
33. Reilly GC, Engler AJ. Intrinsic extracellular matrix properties regulate stem cell differentiation. *J Biomech*. 2010 Jan 5;43(1):55-62.
34. Reuss B, von Bohlen und Halbach O. Fibroblast growth factors and their receptors in the central nervous system. *Cell Tissue Res* 2003; 313: 139-157.
35. Sandvig I, Gadjanski I, Vlaski-Lafarge M, Buzanska L, Loncaric D, Sarnowska A, Rodriguez L, Sandvig A, Ivanovic Z. Strategies to Enhance Implantation and Survival of Stem Cells After Their Injection in Ischemic Neural Tissue. *Stem Cells Dev*. 2017 Apr 15;26(8):554-565.
36. Sarnowska A. Application of organotypic hippocampal culture for study of selective neuronal death. *Folia Neuropathol*. 2002;40(2):101-6.

37. Shen LH, Y Li, J Chen, A Zacharek, Q Gao, A Kapke, M Lu, K Raginski, P Vanguri, A Smith and M Chopp. (2007). Therapeutic benefit of bone marrow stromal cells administered 1 month after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 27:6–13.
38. Sugino K, CM Hempel, MN Miller, AM Hattox, P Shapiro, C Wu, ZJ Huang and SB Nelson. (2006). Molecular taxonomy of major neuronal classes in the adult mouse forebrain. *Nat Neurosci* 9:99–107.
39. Sun W., Buzanska L., Domanska-Janik K., Salvi R.J., Stachowiak M.K. Voltage-sensitive and ligand-gated channels in differentiating neural stem-like cells derived from the nonhematopoietic fraction of human umbilical cord blood. *Stem Cells*. 2005, 23(7), 931-45.
40. 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
41. Sypecka J, Sarnowska A, Gadomska-Szabłowska I, Lukomska B, Domańska-Janik K. Differentiation of glia-committed NG2 cells: the role of factors released from hippocampus and spinal cord. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2013;73(1):116-29.
42. Sypecka J, Sarnowska A. Heterogeneity of local tissue microenvironment influences differentiation of oligodendroglial progenitors. *Folia Neuropathol*. 2013;51(2):103-10.
43. Sypecka J, Sarnowska A. Mesenchymal cells of umbilical cord and umbilical cord blood as a source of human oligodendrocyte progenitors. *Life Sci*. 2015 Oct 15;139:24-9.
44. Sypecka J, Sarnowska A. The neuroprotective effect exerted by oligodendroglial progenitors on ischemically impaired hippocampal cells. *Mol Neurobiol*. 2014 Apr;49(2):685-701.
45. Taguchi A, T Soma, H Tanaka, T Kanda, H Nishimura, H Yoshikawa, Y Tsukamoto, H Iso, Y Fujimori, DM Stern, H Naritomi and T Matsuyama. (2004). Administration of CD34+ cells after stroke enhances neurogenesis via angiogenesis in a mouse model. *J Clin Invest* 114:330–338.
46. Uchida H., Niizuma K., Kushida Y., Wakao S., Tominaga T., Borlongan C.V., Dezawa M. Human Muse Cells Reconstruct Neuronal Circuitry in Subacute Lacunar Stroke Model. *Stroke*. 2017,48(2), 428-435.
1. Wakao S, Kitada M, Kuroda Y, Dezawa M. Isolation of adult human pluripotent stem cells from mesenchymal cell populations and their application to liver damages. *Methods Mol Biol*. 2012;826:89-102.
2. Walczak P, N Chen, JE Hudson, AE Willing, SN Garbuzova-Davis, S Song, PR Sanberg, J Sanchez-Ramos, PC Bickford and T Zigova. (2004). Do hematopoietic cells exposed to a neurogenic environment mimic properties of endogenous neural precursors? *J Neurosci Res* 76:244–254.

3. Zhang J., Li Y., Chen J., Yang M., Katakowski M., Lu M., Chopp M. Expression of insulin-like growth factor 1 and receptor in ischemic rats treated with human marrow stromal cells Brain Res., 1030 (2004), pp. 19-27

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych (artystycznych).

Pracę naukową rozpoczęłam 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 w trakcie ostatnich lat studiów medycznych na II Wydziale Lekarskim WUM. Celem nadrzędnym prowadzonych przeze mnie badań było poznanie mechanizmów opóźnionej śmierci neuronów oraz znalezienie substancji o potencjale neuroprotekcijnym w modelach przejściowego niedokrwienia mózgu. W latach 2000 – 2007, pod kierunkiem Prof. Krystyny Domańskiej-Janik prowadziłam badania, które stanowiły przedmiot mojej rozprawy doktorskiej pt. „*Mechanizmy działania wybranych związków neuroprotekcyjnych na modelach uszkodzeń ischemicznych neuronów sektora CA1 organotypowej hodowli hipokampa szczura*”. Dotyczyły one m.in. opracowania modelu uszkodzenia wolnorodnikowego i ekscytotoksycznego *ex vivo* na organotypowej hodowli skrawków hipokampa szczura. Model ten odwzorowywał zmiany zachodzące podczas epizodu niedokrwienego *in vivo*, dotyczące zarówno specyficznej lokalizacji uszkodzenia w rejonie CA1 hipokampa, jak i jego opóźnionego czasu wystąpienia. Na powyższym modelu sprawdzano efekt neuroprotekcyny wybranych czynników oraz badano szlaki sygnałowe zaangażowane w ich działanie. Wśród badanych związków, silne działanie protekcyjne w stosunku do neuronów sektora CA1 zarówno w modelu *ex vivo* jak i w uszkodzeniu ischemicznym *in vivo* wykazały leki od dawna stosowane w innych chorobach: cyklosporyna A (CsA) i diazepam. Tutaj działanie ochronne CsA związane było z uszczelnieniem kanałów MTP w mitochondriach, zmniejszeniem wpływu cytochromu c i aktywacji kaspazy 3. Również za efekt neuroprotekcyny diazepam, poza mechanizmem sedatywnym i hipotermicznym, odpowiedzialne było jego bezpośrednie „uszczelniające” oddziaływanie na błonę mitochondrialną. Kolejny badany związek - minocyklina, antybiotyk o dodatkowym szeroko dyskutowanym działaniu neuroprotekcijnym w wielu chorobach neurodegeneracyjnych, pomimo zaobserwowanych pozytywnych efektów *in vitro*, nie wykazał ochronnego działania w przebiegu niedokrwienia przedomózgowia u myszokoczka mongolskiego.

Badania dotyczące mechanizmów neuroprotekcji farmakologicznej zostały opisane w poniższych pracach:

1. **Sarnowska A**, Beresewicz M, Zabłocka B, Domańska-Janik K. Diazepam neuroprotection in excitotoxic and oxidative stress involves a mitochondrial mechanism additional to the GABAAR and hypothermic effects. *Neurochem Int.* 2009 Jul-Aug;55(1-3):164-73.
2. Dłuzniewska J, **Sarnowska A**, Beresewicz M, Johnson I, Srail SK, Ramesh B, Goldspink G, Górecki DC, Zabłocka B. A strong neuroprotective effect of the autonomous C-terminal peptide of IGF-1 Ec (MGF) in brain ischemia. *FASEB J.* 2005 Nov;19(13):1896-8. Epub 2005 Sep 6.
3. Domańska-Janik K, Buzańska L, Dłuzniewska J, Kozłowska H, **Sarnowska A**, Zabłocka B. Neuroprotection by cyclosporin A following transient brain ischemia correlates with the inhibition of the early efflux of cytochrome C to cytoplasm. *Brain Res Mol Brain Res.* 2004 Feb 5;121(1-2):50-9.
4. Luchowska E, Luchowski P, **Sarnowska A**, Wielosz M, Turski WA, Urbańska EM. Endogenous level of kynurenic acid and activities of kynurenine aminotransferases following transient global ischemia in the gerbil hippocampus. *Pol J Pharmacol.* 2003 May-Jun;55(3):443-7.
5. Zalewska T, Ziemka-Nalecz M, **Sarnowska A**, Domańska-Janik K. Transient forebrain ischemia modulates signal transduction from extracellular matrix in gerbil hippocampus. *Brain Res.* 2003 Jul 4;977(1):62-9.
6. **Sarnowska A**. Application of organotypic hippocampal culture for study of selective neuronal death. *Folia Neuropathol.* 2002;40(2):101-6.
7. Zalewska T, Ziemka-Nalecz M, **Sarnowska A**, Domańska-Janik K. Involvement of MMPs in delayed neuronal death after global ischemia. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2002;62(2):53-61.

Badania dotyczące neuroprotekcji i mechanizmów aktywowanych po epizodzie niedokrwienia mózgu są przeze mnie nadal kontynuowane we współpracy z Prof. Barbarą Zabłocką i dr Małgorzatą Beresewicz. Projekty te dotyczą molekularnych mechanizmów rozprzestrzeniania się sygnału ischemiczno/ reperfuzyjnego (I/R) w komórce. Obecnie, korzystając ze zwierzęcego modelu niedokrwienia u myszokoczka, koncentrujemy się na poznaniu roli różnych izoform kinaz białkowych C (PKC) związanych z mitochondriami w procesach prowadzących do poischemicznej eliminacji neuronów. Analizując efekty

translokacji PKC β II do mitochondriów, poszukujemy ewentualnego związku tego procesu z poischemiczną neuroprotekcją w regionie CA2-4, DG hipokampa. Nasze pierwsze obserwacje zostały opublikowane w poniższej pracy:

1. Krupska O, **Sarnowska A**, Fedorczyk B, Gewartowska M, Misicka A, Zablocka B, Beresewicz M. Ischemia/Reperfusion-Induced Translocation of PKC β II to Mitochondria as an Important Mediator of a Protective Signaling Mechanism in an Ischemia-Resistant Region of the Hippocampus. *Neurochem Res.* 2017 Aug;42(8):2392-2403.

Od początku pracy w Instytucie, równoległe do prac związanych z moją rozprawą doktorską, prowadziłam doświadczenia dotyczące zastosowania komórek macierzystych/progenitorowych (KM) wyizolowanych z krwi pępowinowej w chorobach neurodegeneracyjnych mózgu. Doświadczenia przeprowadzałam w trzech modelach: *in vitro* - w hodowlach komórkowych, *ex vivo* - z zastosowaniem hodowli organotypowych oraz *in vivo* w modelu ogniskowego uszkodzenia mózgu u szczurów. W trakcie tych badań powstały następujące prace:

1. Domanska-Janik K, Habich A, **Sarnowska A**, Janowski M. Neural commitment of cord blood stem cells (HUCB-NSC/NP): therapeutic perspectives. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2006;66(4):279-91.
2. Jurga M, Markiewicz I, **Sarnowska A**, Habich A, Kozłowska H, Lukomska B, Buzanska L, Domanska-Janik K. Neurogenic potential of human umbilical cord blood: neural-like stem cells depend on previous long-term culture conditions. *J Neurosci Res.* 2006 Mar;83(4):627-37.

Po obronie doktoratu w 2007 r. odbyłam roczny staż w ramach stypendium im. Marii Curie-Skłodowskiej w Leibniz Institute for Neurobiology w Magdeburgu. W trakcie stażu zdobyłam doświadczenie w izolacji, hodowli i charakterystyce mezenchymalnych komórek macierzystych izolowanych ze szpiku. Oprócz poznawania i stosowania technik badawczych t.j. metod biologii molekularnej, metod obrazowania przeżyciowego skrawków, w czasie tego roku zostałam również wprowadzona w działalność projektową Pracowni. Uczestniczyłam w telekonferencjach konsorcjum, zapoznawałam się z zasadami pisania grantów europejskich, jak również funkcjonowaniem pracowni usługowych. Ten okres był dla mnie bardzo owocny i zaważył na ukierunkowaniu moich dalszych badań w obszarze medycyny regeneracyjnej, a powstała w tym czasie publikacja Sarnowska et al. 2009 stanowi jedną z dwóch pracy otwierających moje, opisane powyżej osiągnięcie naukowe.

Po powrocie do Zakładu Neurobiologii Naprawczej w roku 2009 kontynuowałam badania związane z otrzymywaniem mezenchymalnych komórek macierzystych (MSC) z różnych źródeł, jak również nad sposobami ich różnicowania i transplantacji. Te badania dokładniej zostały opisane w osiągnięciu naukowym.

Jednocześnie, w nowo wydzielonej Pracowni Bioinżynierii Komórek Macierzystych, pod kierunkiem Prof. Krystyny Domańskiej-Janik kontynuowałam badania dotyczące sposobów optymalizacji izolacji i hodowli MSC, w celu jak najlepszego przygotowania komórek do zastosowania w Klinice. Prace te dotyczyły otrzymania z heterogennej populacji MSC, subpopulacji pluripotencjalnych komórek macierzystych. Modułując czynniki środowiskowe t.j. stężenie parcjalne tlenu oraz porównując różne metody izolacji komórek, opracowaliśmy warunki uzyskania i prowadzenia hodowli MSC, bogatej w subpopulację pluripotencjalnych komórek. Wyniki tych badań zostały opublikowane w następujących pracach:

1. Sandvig I, Gadjanski I, Vlaski-Lafarge M, Buzanska L, Loncaric D, **Sarnowska A**, Rodriguez L, Sandvig A, Ivanovic Z. Strategies to Enhance Implantation and Survival of Stem Cells After Their Injection in Ischemic Neural Tissue. *Stem Cells Dev.* 2017 Apr 15;26(8):554-565.
2. Lech W, Figiel-Dabrowska A, **Sarnowska A**, Drela K, Obtulowicz P, Noszczyk BH, Buzanska L, Domanska-Janik K. Phenotypic, Functional, and Safety Control at Preimplantation Phase of MSC-Based Therapy. *Stem Cells Int.* 2016;2016:2514917.
3. Drela K, Lech W, Figiel-Dabrowska A, Zychowicz M, Mikula M, **Sarnowska A**, Domanska-Janik K. Enhanced neuro-therapeutic potential of Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells culture. *Cytotherapy.* 2016 Apr;18(4):497-509.
4. Obtulowicz P, Lech W, Strojek L, **Sarnowska A**, Domanska-Janik K. Induction of Endothelial Phenotype From Wharton's Jelly-Derived MSCs and Comparison of Their Vasoprotective and Neuroprotective Potential With Primary WJ-MSCs in CA1 Hippocampal Region Ex Vivo. *Cell Transplant.* 2016;25(4):715-27.
5. Drela K, **Sarnowska A**, Siedlecka P, Szablowska-Gadomska I, Wielgos M, Jurga M, Lukomska B, Domanska-Janik K. Low oxygen atmosphere facilitates proliferation and maintains undifferentiated state of umbilical cord mesenchymal stem cells in an hypoxia inducible factor-dependent manner. *Cytotherapy.* 2014 Jul;16(7):881-92.
6. Buzańska L, Zychowicz M, **Sarnowska A**, Domańska-Janik K. [Bioengineering of neural stem cell niche]. *Postepy Biochem.* 2013;59(2):175-86. Review.

7. Drela K, Siedlecka P, **Sarnowska A**, Domanska-Janik K. Human mesenchymal stem cells in the treatment of neurological diseases. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2013;73(1):38-56. Review.
8. McGuckin CP, Jurga M, Miller AM, **Sarnowska A**, Wiedner M, Boyle NT, Lynch MA, Jablonska A, Drela K, Lukomska B, Domanska-Janik K, Kenner L, Moriggl R, Degoul O, Perruisseau-Carrier C, Forraz N. Ischemic brain injury: a consortium analysis of key factors involved in mesenchymal stem cell-mediated inflammatory reduction. *Arch Biochem Biophys*. 2013 Jun;534(1-2):88-97

Innym aspektem mojej działalności naukowej był udział w latach 2008-2012 w projektach badawczych prowadzonych przez dr hab. Joannę Sypecką, dotyczących udziału oligodendrogleju w procesach naprawczych zachodzących po uszkodzeniu ischemicznym, oligogenezie oraz potencjale sekrecyjnym oligodendrogleju w zależności od środowiska. W oparciu o uzyskane w trakcie trwania projektu wyniki powstały poniższe publikacje:

1. Sypecka J, **Sarnowska A**. Mesenchymal cells of umbilical cord and umbilical cord blood as a source of human oligodendrocyte progenitors. *Life Sci*. 2015 Oct 15;139:24-9.
2. Sypecka J, **Sarnowska A**. The neuroprotective effect exerted by oligodendroglial progenitors on ischemically impaired hippocampal cells. *Mol Neurobiol*. 2014 Apr;49(2):685-701.
3. Sypecka J, **Sarnowska A**, Gadomska-Szabłowska I, Lukomska B, Domańska-Janik K. Differentiation of glia-committed NG2 cells: the role of factors released from hippocampus and spinal cord. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2013;73(1):116-29.

Równocześnie z prowadzeniem badań podstawowych, po zakończeniu studiów medycznych, w 2002 r rozpoczęłam pracę w szpitalu. Od 2006r pracuję w Klinice Neurologii i Epileptologii szpitala CMKP im. W. Orłowskiego na stanowisku asystenta. W 2013r, po zdaniu państwowego egzaminu specjalizacyjnego, otrzymałam tytuł specjalisty neurologa. Od 2000r, za zgodą Dyrektora IMDiK PAN, jak i Ordynatora Kliniki Neurologii i Epileptologii CMKP, prowadzę pracę kliniczną oraz naukową. W ramach działalności naukowej w CMKP związanej z moim zainteresowaniem epileptologią powstała publikacja pt. „Interval analysis of interictal EEG: pathology of the alpha rhythm in focal epilepsy.” Pyrzowski J, Siemiński M, **Sarnowska A**, Jedrzejczak J, Nyka WM. *Sci Rep*. 2015 Nov 10;5:16230.”

Jako lekarz, spotykający się na co dzień z pacjentami po udarach czy urazach mózgu często z dużym stopniem niepełnosprawności, zawsze miałam nadzieję na wprowadzenie terapii komórkowej do Kliniki. Z tego powodu przełomowym wydarzeniem w mojej pracy naukowej było uczestnictwo w 2008 roku w pierwszym w Polsce, a także na świecie, eksperymencie medycznym przeprowadzonym pod kierownictwem Prof. Krystyny Domańskiej-Janik, we współpracy z CZD i Polskim Bankiem Komórek Macierzystych dotyczącym transplantacji autologicznych komórek macierzystych z krwi pępowinowej do komór bocznych mózgu u dziecka w stanie wegetatywnym, po nagłym zatrzymaniu krążenia i globalnym uszkodzeniu mózgu. Kryteria włączenia, wywiad oraz przebieg i wyniki eksperymentu zostały opublikowane w poniższej pracy:

1. Jozwiak S, Habich A, Kotulska K, **Sarnowska A**, Kropiwnicki T, Janowski M, Jurkiewicz E, Lukomska B, Kmiec T, Walecki J, Roszkowski M, Litwin M, Oldak T, Boruczkowski D, Domanska-Janik K. Intracerebroventricular Transplantation of Cord Blood-Derived Neural Progenitors in a Child With Severe Global Brain Ischemic Injury. *Cell Med.* 2010 Nov 2;1(2):71-80.

Od tamtego czasu obserwujemy gwałtowny rozwój medycyny regeneracyjnej opartej na przeszczepach komórek macierzystych. Szybka komercjalizacja takiego leczenia nie zawsze poparta jest wiedzą podstawową i przeprowadzana zgodnie z zasadami "medycyny opartej na faktach". Będąc obserwatorem różnych eksperymentów klinicznych, również prowadzonych poza Europą, zdaję sobie sprawę z potrzeby rzetelnych badań dotyczących opracowania odpowiednich procedur związanych z transplantacją KM, zapewniających choremu bezpieczeństwo i dających realną szansę na powodzenie terapii.

W 2015 roku, IMDiK PAN otrzymał dodatkowe fundusze przeznaczone na utworzenie Platformy Badań Translacyjnych w zakresie Medycyny Regeneracyjnej (PBTMR), w której objęłam kierownictwo. Do głównych zadań Platformy należy nawiązywanie i organizowanie współpracy pomiędzy naukowcami a lekarzami w celu prowadzenia pilotowych badań klinicznych, opartych o wiedzę podstawową dotyczącą komórek o potencjale regeneracyjnym. W ramach Platformy udało nam się stworzyć w pełni wyposażone Laboratorium do badań przedklinicznych. W roku 2015 PBTMR była inicjatorem projektu angażującego ośrodki neurologii/neurochirurgii (Warszawski Uniwersytet Medyczny - Klinika Neurologii; Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego – Klinika Neurologii i Chirurgii Plastycznej; Instytut Matki i Dziecka – Klinika Neurologii). Aby walidować i wdrażać procedury oparte na wykorzystaniu komórek macierzystych, w 2016 r byłam

odpowiedzialna za wybudowanie i uruchomienie nowoczesnego Banku Tkanek i Komórek oraz Laboratorium klasy GMP w IMDiK PAN.

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. Do dziś przeprowadzono 15 zabiegów u 5 chorych. Wspólnie z Kliniką Neurologii i Kliniką Chirurgii Instytutu Matki i Dziecka w Warszawie opracowano kryteria włączenia pacjentów z autoimmunologiczną padaczką lekooporną do wypracowanej eksperymentalnej terapii regeneracyjnej ADRC. W latach 2015-2017 prowadzono, pierwszy raz w Polsce, zabiegi przeszczepienia autologicznych ADRC do płynu mózgowo-rdzeniowego w lekoopornej padaczce o podłożu autoimmunologicznym u dzieci. Zabiegi jak i okres pozabiegowy przebiegły bez powikłań. Badania przeprowadzone na grupie 6 chorych dają nadzieje na wyodrębnienie grupy pacjentów, u których ta terapia przyniesie wymierną korzyść i da szansę na powrót do normalnego funkcjonowania na co dzień.

W związku z pracą w Klinice Neurologii i Epileptologii CMKP oraz w IMDiK PAN prowadziłam zajęcia dydaktyczne z zakresu neurologii dla rezydentów oraz z zakresu neurobiologii dla doktorantów. Zostałam autorem rozdziałów w dwóch podręcznikach dotyczących neurologii i neurobiologii. Byłam również opiekunem 3 prac magisterskich oraz promotorem pomocniczym 2 prac doktorskich. Oprócz pracy naukowej biorę aktywny udział w propagowaniu wiedzy dotyczącej racjonalnego zastosowania komórek macierzystych w terapii, zarówno w trakcie popularnonaukowych spotkań np. na Festiwalu Nauki, jak również uczestnicząc 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”).

Przedstawione powyżej badania prowadziłam 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 byłam kierownikiem, w dwóch kolejnych (konsorcyjnych) osobą odpowiedzialną za jedno z zadań. Kolejne 3 projekty, w których byłam wykonawcą, miały charakter międzynarodowy (Załącznik 5). Mój dotychczasowy dorobek naukowy obejmuje 23 prace oryginalne

opublikowane w czasopismach z listy filadelfijskiej o sumarycznym współczynniku oddziaływania IF wg bazy Journal Citation Reports: 94,852, które były cytowane wg bazy Web of Science: 61, a mój indeks Hirscha wg bazy Web of Science wynosi 14 (dane na dn. 18.12.2017r). Ponadto jestem współautorem 4 publikacji w czasopismach międzynarodowych i krajowych nie indeksowanych na liście filadelfijskiej. Mój dorobek uzupełnia 26 referatów wygłoszonych na zjazdach krajowych (9) i międzynarodowych (17) oraz 143 prezentacje plakatowe (Załącznik 5).

Warszawa, 08-02-2018

