INSTYTUT GENETYKI CZŁOWIEKA POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Instytut Genetyki Człowieka
Polskiej Akademii Nauk

ul. Strzeszyńska 32 • 60-479 Poznań • tel. (61) 8233-011 • fax (61) 8233-235
www.igcz.poznan

Ocena działalności

naukowej, dorobku naukowego oraz cyklu publikacyjnego satnowiącego podstawę postępowania habilitacyjnego („Immunoregulacyjna rola komórek macierzystych szpiku kostnego w terapii autoimmunologicznego zapalenia mózgu i rdzenia myszy, modelu zwierzęcym stwardnienia rozsianego") dr n. med. Marioli Świderek-Matysiak adiunkta Katedry i Kliniki Neurologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Dr Mariola Świderek-Matysiak ukończyła z wyróżnieniem Wydział Lekarski Akademii Medycznej w Łodzi w roku 1997, w drugiej połowie studiów podejmując Indywidualny Tok Studiowania w Klinice Neurologii AM w Łodzi. W ostatnim roku akademickim studióe medycznych uzyskała Stypendium Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej za bardzo dobre wyniki w nauce. Rok później podjęła naukę i badania w obrębie Studium Doktoranckiego na Uniwersytecie Medycznym w Łodzi (miejsce pracy naukowo-badawczej: Klinika Neurologii AM w Łodzi), co następnie zaowocowało publiczną obroną (w roku 2002) wyróżnionej pracy doktorskiej w roku 2002 (tytuł rozprawy: „Wpływ należącego do rodziny TNF ligandu indukującego apoptozę (TRAIL) na ludzkie komórki glejowe", promotor: prof. Krzysztof Selmaj). Następnie w roku 2004 i 21010 uzyskała kolejno specjalizacje I oraz II stopnia w dziedzinie neurologii. Kandydatka konsekwentnie przemierza szczeble swojej profesjonalnej kariery poczynając od Studium Doktoranckiego i pracy w Klinice Neurologii poprzez stanowiska asystenta i adiunkta aż do chwili obecnej.

Kariera naukowa habilitantki jest od początku nakierowana ściśle wokół zagadnień neurologicznych i jednym z bardziej imponujących cykli publikacyjnych jest mechanizm uszkodzenia ludzkich oligodendrocytów na drodze apoptozy (z udziałem mediatorów cytokinowych), sytuując kandydatkę w kręgu zagadnień neuroimmunologicznych, zjawisk trudnych, jakkolwiek dających nadzieję na zrozumienie uszkodzeń centralnego układu nerwowego i skorzystania z tej wiedzy w konstruowaniu nowych algorytmów diagnostyczno-terapeutycznych. Jednym z mechanizmów oddziałujących na programowaną śmierć komórki jest rodzina czynników TNF, jako mediatorów o charakterze pro-zapalnym. Ponieważ uszkodzenie

oligodendrocytów jest jednym z kluczowych elementów patogenezy stwardnienia rozsianego, jest istotnym określenie mechanizmu wiodącego do śmierci oligodendrocytów, któremu możnaby potencjalnie zapobiec. Rodzina czynnika TNF ma oddziaływanie plejotropowe, nie jest zatem niespodzianką, że habilitantka wykryła różnice w zakresie oddziaływania samej cytokiny TNF oraz związanego z nią czynnika TRAIL, ten ostatni jest wybitnie nakierowany na wymuszenie apoptozy, co zostało udokumentowane zarówno w mieszaninach pierwotnych jak i oligodendrocytarnych linii komórek nowotworowych i jak się można domyśleć stanowiło to przewodnią myśl pracy doktorskiej kandydatki. Ten cykl prac został świetnie opublikowany w kilku publikacjach o wysoko notowanym dużym współczynniku oddziaływania w piśmie ***Brain*** (czynnik oddziaływania >7,0) oraz ***Glia*** (czynnik oddziaływania, IF >5,0). Prace łącznie stanowią skumulowany czynnik oddziaływania około 30 i cytowane były dotychczas w pismniennictwie światowym ponad 150 razy.

W innym projekcie naukowym, habilitantka była zaangażowana w badaniach nad białkiem NogoA, które jest inhibitorem regeneracji aksonów, a ulega ekspresji na oligodendrocytach. W opublikowanej pracy w piśmie ***Neurology*** (czynnik oddziaływania >6,0) udowodniono, że rozpuszczalna forma fragmentu tego białka, o wielkości 20-kDA, jest obecna w płynie mózgowo-rdzeniowym u pacjentów ze stwardnieniem rozsianym, jednak niezależnie od czasu trwania i natężenia aktywności tej choroby. Jak można się zorientować z nadesłanych materiałów, habilitantka nie tytlko uczestniczyła w pracach naukowo-badawczych oraz późniejszej publikacji na temat białka Nogo A, ale i również w opracowaniu zastrzeżenia patentowego dotyczącego wartości fragmentu białka Nogo A w diagnostyce (być może również i prognozie) pacjentów ze stwardnieniem rozsianym. Żałować należy, że habilitantka nie uchyla „rąbka tajemnicy" nad praktycznymi aspektami tego patentu i czy jest on również wykorzystywany przez innych autorów, zarysowując jedynie, że dalsze prace nad specyficznością tego biomarkera trwają. Można się jedynie domyślać z późniejszej publikacji poświęconej tej tematyce, że znaczenie białka Nogo A w stwardnieniu rozsianym może nie być wcale łatwym problemem (opublikowano w ***Neurology,*** o czynniku oddziaływania powyżej 8,0).

W innym aspekcie dotyczącym badań nad stwardnieniem rozsianym habilitantka dowodzi obniżenia ekspresji wszystkich izoform receptorów steroidowych u pacjentów nie odpowiadających pozytywnie na leczenie sterydami (opublikowano w piśmie ***Mult Scler,*** współczynnik oddziaływania powyżej 3,0). Jednocześnie w tym Projekcie

dokonano szerszej analizy obniżenia ekspresji tychże receptorów obserwując zwiększoną obecność białka hsp90 (należącego do rodziny białek szoku termicznego) kompleksującego wymienione receptory. Białka szoku termicznego to grupa białek, których ekspresja wzrasta wtedy, kiedy komórki są narażone na działanie czynników egzogennych np. zarówno wysokiej jak i niskiej temperatury, stresu osmotycznego, ekspozycji metali ciężkich, w stanach zapalnych, infekcjach itd. Stąd nie są zaskoczeniem następne obserwacje, w których pacjentów ze stwardnieniem rozsianym, podddanym stresowi cieplnemu i udokumentowano kilkukrotny wzrost ekspresji w stosunku do zdrowych kontroli. Nie dowiadujemy się jednak z opracowania habilitantki, czy obserwowany wzrost białek hsp jest w jakiejkowiek mierze związany z aktywnością choroby i/lub czy może służyć prognozowaniu jej przebiegu czy też monitorowaniu przebiegu leczenia (opublikowano w ***J Neurosci Res*** o czynniku oddziaływania około 3,0). W ostaniej pracy z tego cyklu dr Świderek uczestniczyła w badaniach nad rolą plazmacytoidalnych komórek dendrytycznych u pacjentów ze stwardnieniem rozsianym. Badając odpowiedź tychże komórek (pDC) na stymulację receptora Toll 7, jego ekspresja w stosunku do zdrowych kontroli była znacząco obniżona. Wskazuje to na funkcjonalny deficyt tego ramienia odpowiedzi immunologicznej, definiowanej jako wrodzona (opublikowano w piśmie ***Clin Immunol*** o znaczącym czynniku oddziaływania około 4,0).

W podsumowaniu należy stwierdzić, że habilitantka wykazuje się całkiem niezłym dorobkiem publikacyjnym – przy czym do doktoratu opublikowała 6 prac o całkiem pokaźnym skumulowanym wskaźniku oddziaływania (IF), tj. około 20. Po doktoracie zaś zwiększyła swój dorobek oryginalny o dalszych 10 publikacji, ze skumulowanym czynnikiem oddziaływania ogółem – 58,014, liczbą cytowań powyżej 250 oraz indeksem Hirscha równym 8. Jest to całkiem przyzwoity dorobek, pozwalający na przystąpienie do procedury zmierzającej w kierunku usamodzielnienia się. W pięciu oryginalnych doniesieniach jest pierwszym autorem, a w 13 sytuuje się na pierwszych dwóch miejscach autorskich. Należy też z uznaniem powitać fakt, że porowadzone cykle eksperymentalne ogniskują się w kilku tylko płaszczyznach badawczych i obejmują mechnizmy apoptozy ludzkich oligodendrocytów oraz immunopatologiczne podłoże stwardnienia rozsianego, czyniąc kandydatkę nowoczesnym lekarzem poszukującym w naukach podstawowych nowych mechanizmów schorzeń i konsekwentnie rozwijającym uklad modelowy (EAE mysi) w cyklu publikacji stanowiących podstawę przewodu habilitacyjnego. Co warto podkreślić, kandydatka aktywnie uczestniczy w pozyskiwaniu

(była kierownikem w dwóch) oraz realizacji grantów badawczych (wykonawca trzech projektów), co jest współczesną umiejętnością uprawiania nauki. Jest laureatką 8 nagród, w tym dwóch międzynarodowych – za przedstawienie oryginalnego doniesienia na branżowych sympozjach w Madrycie i Bostonie. Łącznie jest współautorem 35 doniesień na konferencjach międzynarodowych i 30 doniesień na naukowych imprezach krajowych. Aktywnie, jako pierwszy autor, przedstawiła 8 oryginalnych doniesień na imprezach naukowych. Co także warte podkreślenia kandydatka nie stroni od prac popularyzatorskich będąc autorem lub wspólautorem rozdziałów w edycjach książkowych, podjęła się także tłumaczenia rozdziału literatury fachowej i była opiekunem projektów doktoranckich oraz kilku studenckich projektów naukowych przedstwianych na konferencjach STN. Jest także opiekunem specjalizacji dwóch lekarzy-rezydentów z zakresu neurologii. Działa w organizacjach branżowych będąc członkiem Polskiego Towarzystwa Neurologicznego oraz członkiem Zarządu Europejskiego Komitetu d/s Stwardnienia Rozsianego. A zatem dziedziny dydaktyczna i organizacyjna również wpisują się do aktywności kandydatki dpoepełniając jej pozytywnego obrazu.

W cyklu prac stanowiących podstawę dla przewodu habilitacyjnego znajdują się zajwiska neuroimmunologiczne rozpatrywane w niejakim ekwiwalencie dla ludzkiego stwardnienia rozsianego – tj. w modelu autoimmunologicznego zapalenia mózgu i rdzenia myszy. We wszystkich trzech publikacjach kandydatka jest pierwszym autorem, 2 doniesienia zostały opublikowane w ***J Neuroimmunol*** (wartościowe pismo branżowe o czynniku oddziaływania ok. 3,0) a jedna w bardzo prestiżowym i cenionym piśmie immunologicznym – ***J Immunol,*** IF powyżej 5. Wszystkie trzy tworzą spójny cykl odświadczalny

Charakteryzując tę niewatpliwie interesującą serię prac, zaczynam je omawiać zgodnie z chronologią publikacyjną. A zatem pierwsza z cyklu prac przedstawia możliwy mechanizm łagodzenia objawów EAE (ang. experimental autoimmune encephalomyelitis) u myszy. Autorzy, w tym zwłaszcza habilitantka, izolowali ze szpiku kostnego syngenicznych myszy zawiesinę komórek macierzystych szpiku kostnego o fenotype $Lin^{-}Sca^{+}$. które nazywają komórkami pluripotencjalnymi, jednakże wzobogaconymi o komórki typu mezenchymalnego, co raczej (moim zdaniem) kwestionuje ich pluripotencjalność (w każdym razie dowód pluripotencjalności przygotowanej zawiesiny komórkowej nie został przeprowadzony) i ktore dożylnie zostają wprowadzone do myszy z wcześniej zaindukowanym EAE. Jak się można

spodziewać większość migrujących komórek zasiedla się w limfatycznych narządach obwodowych (śledziona, wątroba, szpik kostny) , a nie strukturach OUN, takich jak pień mózgu czy okolicz rdzenia kręgowego), tak więc założeniem pracy było zbadanie potencjału immunogennego komórek pozyskanych z narządów obwodowych (konkretnie komórek dendrytycznych), nie zaś ich ekwiwalentów z OUN, w modelu EAE. Habilitantka udowadnia wzrost poziomu dioksygenazy indoleaminowej – IDO (a także intereferonu gamma produkowanego przez komórki CD11c), znanej z faktu katabolizowania tryptofanu, a prze to niedopuszczającej do rozwoju efektorowej odpowiedzi immunologicznej. Autorzy, w interpretacji prowadzonych przez nich doświadczeń dopuszczaja immunoregulacyjny charakter wydzielanego interferonu gamma raczej jako induktora syntezy IDO, a nie czynnika wzmagającego odpowiedź immunologiczną. Oczywiście założeniem jest, że antygen poddawany reakcji komórkowej (pochodzący z mieliny) musi skutecznie przenikać do narządów obowodowych poprzez rozluźnioną barierę krew-mózg. Nie wiadomo czy nie lepsza dla interprertacji obrazu byłaby implantacja zawiesiny komórkowej drogą płynu mózgowo-rdzeniowego. Ponadto IDO i jego udział w patofizjologii układu odpornościowego u człowieka nie jest znaczący, o ile w ogóle ma jakikolwiek wpływ. Niemniej pracę publikowano w roku 2008 i z pewnością układy modelowe nieco się od tego czasu zmieniły.

Następna praca z omawianego cyklu (również opublikowana w ***J Neuroimmunol***, czynnik oddziaływania ok. 3,0) jest w samej rzeczy pokrewna z poprzednią i przeprowadzona jest w analogicznym modelu mysim – eksperymentalnym autoimmunologicznym zapaleniu mózgu i rdzenia. Autorzy ciągle używają mylącego skrótu BMSC (w literaturze znanym raczej jako *bone marrow stem cells)*, zamiast faktycznie oddającego treść używanej przez nich populacji komorkowej, dla której powinno stosować się skrót BMMSC – *bone marrow mesenchymal stem cells.* Wzbogacone w markery $Lin^{-}Sca^{+}$ komórki pochodzenia szpikowego wprowadzane były dożylnie do myszy z uprzednio zaindukowanym EAE – przy czym zróżnicowano populacje BMMSC w komórki pochodzenia nerwowego (a przynajmniej posiadające takowe markery) lub też stosowano populacje komórkowe niezróżnicowane. Zaobserwowano fundamentalną zmianę w zakresie hamowania objawów zespołu EAE stosując jedynie populację niezróżnicowaną. Korelowało to z dużym potencjałem sekrecji prostaglandyny E2, a nie interleukiny 10 czy też transformującego czynnika beta przez te komórki (pewna niespodzianka). Jednocześnie stosowano zawiesiny

komórkowe izolowane ze śledziony, w którym to narządzie obserwuje się wysoką migrację komórek pochodzenia szpikowego, dokumentując w nich (lizaty) techniką immunoblotowania typu Western zaindukowane białko IDO, które, jak można sądzić z pracy poporzedniej, jest głównym białkiem efektorowym, odpowiedzialnym za złagodzenie objawów EAE. Stosowany w badaniu inhibitor PGE2, meloxicam, hamował zarówno sekrecję (poziom) prostaglandyny E2 jak i stężenie IDO, dokumentując związek przyczynowo-skutkowy pomiędzy nimi. W tej sytuacji należy uznać za udowodniony pewien paradoks, że bardziej skuteczny w obrębie stanu zapalnego, pojawiającego się w OUN jest transfer komórek niezróżnicowanych niż zróżnicowanych neuronalnie. Te ostatnie posądzać można było za bardziej skuteczne – niemniej nie wiadomo czy decydującym czynnikiem dla tych obserwacji nie byla by przypadkiem droga podania. Być może wskazane byłyby równoległe obserwacje z zastosowaniem podania komórek do płynu mózgowo-rdzeniowego u myszy z EAE.

Trzecia praca zamykająca cykl doświadczeń z indukowanym zapaleniem mózgu i rdzenia u myszy wyjaśnia w dużej mierze obserwowany wcześniej mechanizm złagodzenia objawów tego zespołu (publikacja w ***J Immunol***, czynnik oddziaływania powyżej 5). Z poprzednich publikacji wynika zróżnicowane oddziaływanie komórek BMMSC (wzbogaconych o frakcję mezenchymalną, a pochodzących ze szpiku kostnego) na EAE w zależności czy ekspresjonują one markery macierzystych komórek neuronalnych czy też nie. Jednocześnie skojarzono, że te, które markery macierzystych komórek neuronalnych nabywają – tracą swoje funkcje immunoregulatorowe, kiedy są transferowane do myszy z indukowanym zapaleniem mózgu i rdzenia. Kandydatka wraz z grupą autorów implikuje zaangażowanie w ten proces regulatorowego mikroRNA, z której to rodziny niektóre z nich zaangażowane są w regulację odpowiedzi immunologicznej zarówno typu wrodzonego jak i nabytego. W rodzinie regulatorowych mikroRNA, odpowiedzialnych za różnicowanie neuronalne kandydatka dokonała izolacji całkowitego RNA z obu typów badanych zawiesin komórkowych (BMMSC natywne oraz zróżnicowane do komórek neuronalnych) i techniką mikromacierzy udokumentowała, że w zróżnicowanych neuronalnie BMMSC o najwyższej ekspresji mikroRNA wystąpiło regulatorowe miR-146a. Aby udowodnić, że właśnie mikroRNA 146a odopowiedzialne jest za utratę funkcji immunoregulatorowych, zastosowano selektywnego antagonistę (antagomir), którego transfekcja obniżyła transkrypcję miR-146a aż o 90%. Z kolei transfer transfekowanej antagomirem zawiesiny komórkowej BMMSC zlagodził symptomy indukowanego EAE u myszy. Tak więc, selektywna

blokada miR-146a udokumentowała immunoregulacyjny mechanizm niezróżnicowanej populacji komórek BMMSC transferowanerj do myszy z EAE. Następnie zmapowano pozycję miR-146a do jego przewidywanego miejsca odzziaływania dla docelowych transkryptów mRNA i wykrytyo, że miR-146a może blokować gen kodujący syntazę PGE2 (*ptges-2*). Następnie stwierdzono, że podwyższona ekspresja miR-146a w niezróżnicowanych komórkach BMMSC powodowała zahamowanie produkcji syntazy PGE2 oraz jej sekrecji. Z kolei zablokowanie syntezy mikroRNA 146a przywracało syntezę PGE2, a co za tym idzie, immunoregulatorową funkcję komórek BMMSC. W ten sposób udowodniono, że to regulatorowa funkcja miR-146a odgrywa krytyczną rolę w kontroli immunoregulacyjnego potencjału komórek BMMSC, co powoduje dalsze kaskadowe oddziaływanie wykazanych substancji efektorowych.

Uważam, że ten cykl prac eksperymentalnych jest nadzwyczaj spójny, a kandydatka wykazuje duże umiejętności w posługiwaniu się rozmaitymi, zaawansowanymi technikami molekularnymi oraz konstruowaniem i/lub konsekwentnym dokumentowaniem postawionych przez siebie hipotez badawczych. Fakt, że habilitantka pracuje w zespole naukowym nie umniejsza wcale jej zasług, ponieważ tylko w taki sposób można dziś odpowiadać problemowo na postawione pytania badawcze w naukach empirycznych. Dołączone do autoreferatu oświadczenia współautorów dokumentują jednoznacznie jdecydujący udział sprawczy kandydatki w powstaniu omawianego cyklu prac, jak również rolę inicjującą habilitantki jak i realizacyjną w tychże pracach.

Biorąc powyższe pod uwagę, uważam, że zarówno dorobek ogólny kandydatki, publikacyjny, bibliometryczny jak i organizacyjno-dydaktyczny spełnia wymogi stawiane kandydatom do uzyskania stopnia doktora habilitowanego i w pełni przekonany stawiam wniosek do Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie dr. Marioli Świderek-Matysiak do dalszych etapów przewodu habilitacyjnego.

Poznań, dnia 7 maja, 2015 roku

Prof. dr hab. Maciej Kurpisz