

RADA DOSKONAŁOŚCI NAUKOWEJ PIECZĘĆ DEKRETACJI	
Data dekretacji: 21.01.21	Podpis osoby dekretującej: <i>[Signature]</i>
Nazwa komórki organizacyjnej: 23	Osoba: D2
Inne uwagi:	

Collegium Medicum Uniwersytetu
Wielkopolskiego, Al. Wolności 32, 61-082 Olsztyn
(nazwa i dane adresowe podmiotu habilitującego,
wybranego do przeprowadzenia postępowania)
za pośrednictwem:
Rady Doskonałości Naukowej
pl. Defilad 1
00-901 Warszawa
(Pałac Kultury i Nauki, p. XXIV, pok. 2401)

Paulina Matyja Gymborska
(imię i nazwisko wnioskodawcy)

Uniwersytet Wielkopolski, Wydział Lekarski
(miejsce pracy/jednostka naukowa)

Rada Doskonałości Naukowej	
Rada Doskonałości Naukowej	
Dział Kancelaryjny	
Dział Kancelaryjny	
WPLYNEŁA 1: 02.08.2021	
Znak sprawy: 23.5000.146.2021	
Podpis: <i>[Signature]</i>	Zaświadczenie: <i>[Signature]</i>

Wniosek

z dnia 01.07.2021 r.

o przeprowadzenie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego
w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie¹

nauki medyczne

Określenie osiągnięcia naukowego będącego podstawą ubiegania się o nadanie stopnia
doktora habilitowanego

„Modelowanie choroby neurodegeneracyjnej człowieka
oraz możliwości ich leczenia (wzrostek zwierząt)”

Wnioskuje – na podstawie art. 221 ust. 10 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie
wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.) – aby komisja habilitacyjna podejmowała
uchwałę w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w głosowaniu **tajnym/jawnym***²

Zostałem poinformowany, że:

Administratorem w odniesieniu do danych osobowych pozyskanych w ramach postępowania w
sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego jest Przewodniczący Rady Doskonałości Naukowej
z siedzibą w Warszawie (pl. Defilad 1, XXIV piętro, 00-901 Warszawa).

Kontakt za pośrednictwem e-mail: kam.elawiana@rdn.gov.pl, tel. 22 656 60 98 lub w siedzibie organu.
Dane osobowe będą przetwarzane w oparciu o przesłankę wskazaną w art. 6 ust. 1 lit. c)
Rozporządzenia UE 2016/679 z dnia 27 kwietnia 2016 r. w związku z art. 220 - 221 oraz art.
232 - 240 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, w celu
przeprowadzenie postępowania o nadanie stopnia doktora habilitowanego oraz realizacji praw i
obowiązków oraz środków odwoławczych przewidzianych w tym postępowaniu.

Szczegółowa informacja na temat przetwarzania danych osobowych w postępowaniu dostępna jest
na stronie www.rdn.gov.pl/klauzula-informacyjna-celu.html

Paulina Matyja Gymborska
(podpis wnioskodawcy)

Załączniki:

¹ Klasyfikacja dziedzin i dyscyplin wg. rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 20 września
2018 r. w sprawie dziedzin nauki i dyscyplin naukowych oraz dyscyplin w zakresie sztuki (Dz. U. z 2018 r. poz.
1818).

² * Niepotrzebne skreślić.

Autoreferat

*„Modelowanie chorób neurodegeneracyjnych człowieka oraz możliwości
ich leczenia u dużych zwierząt”*

dr n.rol. Izabela Małysz-Cymborska

Katedra Neurochirurgii

Wydział Lekarski, Collegium Medicum

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Olsztyn 2021

1. Imię i nazwisko

Izabela Małysz-Cymborska

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

Stopień naukowy: doktor nauk rolniczych, Oddział Biologii Rozrodu, Instytut Rozrodu i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie, 2015, tytuł rozprawy doktorskiej: „Wpływ egzogennych gonadotropin na ekspresję enzymów szlaku syntezy prostaglandyn oraz systemu VEGF/VEGFR w jajowodzie świni w okresie poowulacyjnym”

Tytuł: Magister biologii, Wydział biologii, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, 2009

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

07.2019 – obecnie Asystent w projekcie "Endowaskulamy model udaru niedokrwiennego u świni domowej – platforma do identyfikacji celów terapeutycznych oraz biomarkerów", OPUS, NCN, Katedra Neurochirurgii, Wydział Lekarski, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Olsztyn

01.2018 - 12.2018 Adiunkt w projekcie "Wykorzystanie potencjału regeneracyjnego mezenchymalnych komórek macierzystych" Explore Me, Startegmed, NCBR, Katedra Neurochirurgii, Wydział Lekarski, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Olsztyn

07.2016 - 07.2019 Główny wykonawca w projekcie "Monitorowana w MRI transplantacja ludzkich progenitorów glejowych umieszczonych na nośnikach hydrożelowych do kanału kręgowego zwierząt w celu leczenia stwardnienia zanikowego bocznego" NanoTech4ALS, NCBR, Katedra Neurologii i Neurochirurgii, Wydział Lekarski, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Olsztyn

08.2015 – 12.2017 Adiunkt w projekcie "Zastosowanie progenitorów glejowych w leczeniu stwardnienia zanikowego bocznego", GRP&ALS, Strategmed, NCBR, Katedra Neurologii i Neurochirurgii, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Olsztyn

- 02.2013 – 02.2016 Kierownik grantu "Wpływ egzogennych gonadotropin na syntezę prostaglandyn w jajowodzie świni", Preludium 3, NCN, Zakład Mechanizmów Działania Hormonów, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN, Polska
- 03.2013 – 05.2015 Wykonawca w grantie "Udział chemokin w regulacji funkcji ciała żółtego", OPUS, NCN, Zakład Mechanizmów Działania Hormonów, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN, Olsztyn
- 10.2010 – 06.2012 Wykonawca w grantie "Wpływ superowulacji na ekspresję szlaku sygnałowego VEGF w jajowodzie świni", Zakład Mechanizmów Działania Hormonów, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN, MNISW, Olsztyn

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawa o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.).

4.1. Osiągnięcie stanowi cykl publikacji powiązanych tematycznie pod wspólnym tytułem:
„Modelowanie chorób neurodegeneracyjnych człowieka oraz możliwości ich leczenia u dużych zwierząt”

Prezentowane osiągnięcie naukowe jest podsumowaniem moich kilkuletnich badań nad modelowaniem chorób neurodegeneracyjnych i możliwości terapeutycznych u dużych zwierząt, prowadzonych w Katedrze Neurochirurgii Wydziału Lekarskiego UWM w Olsztynie, we współpracy z Uniwersytetem Johna Hopkina w Baltimore w USA.

Osiągnięcie obejmuje cztery artykuły naukowe, opublikowane w latach 2018 - 2021, w czasopiśmie indeksowanym w Journal Citation Reports (JCR). We wszystkich publikacjach pełniłam rolę osoby projektującej i wykonującej doświadczenia, jestem autorką tekstu i rycin oraz osobą odpowiedzialną za ostateczny wygląd publikacji.

4.2. Lista publikacji wchodzących w skład osiągnięcia

1. Dominika Golubczyk, L Kalkowski, J Kwiatkowska, M Zawadzki, P Holak, J Glodek, K Milewska, A Pomianowski, M Janowski, Z Adamiak, P Walczak, **I Małysz-Cymborska***. Endovascular model of ischemic stroke in swine guided by real-time MRI. Scientific reports. 2020; 10 (1), 1-10. (MNISW₂₀₂₀ 140 pkt; IF₂₀₂₀ 3,998)

2. Lukasz Kalkowski, **Izabela Malysz-Cymborska**, Dominika Golubezyk, Mirosław Janowski, Piotr Holak, Kamila Milewska, Dorota Kedziorek, Zbigniew Adamiak, Wojciech Maksymowicz, Piotr Walczak MRI-guided intracerebral convection-enhanced injection of gliotoxins to induce focal demyelination in swine. PLoS One. 2018; 13(10):e0204650. (MNiSW₂₀₁₈, 40 pkt; IF₂₀₁₈ 2,766)

3. **Izabela Malysz-Cymborska**, Dominika Golubezyk, Lukasz Kalkowski, Adam Burezyk, Mirosław Janowski, Piotr Holak, Katarzyna Olbrych, Joanna Sanford, Kalina Stachowiak, Kamila Milewska, Przemysław Gorecki, Zbigniew Adamiak, Wojciech Maksymowicz, Piotr Walczak. MRI-guided intrathecal transplantation of hydrogel-embedded glial progenitors in large animals. Scientific Reports. 2018; 7(8):16490. (MNiSW₂₀₁₈ 40 pkt; IF₂₀₁₈ 4,011)

4. **Izabela Malysz-Cymborska**, Dominika Golubezyk, Lukasz Kalkowski, Joanna Kwiatkowska, Michał Zawadzki, Joanna Głodek, Piotr Holak, Joanna Sanford, Kamila Milewska, Zbigniew Adamiak, Piotr Walczak, Mirosław Janowski. Intra-arterial transplantation of stem cells in large animals as a minimally-invasive strategy for the treatment of disseminated neurodegeneration. Scientific Reports. 2021; 22(11):6581. (MNiSW₂₀₂₁ 140 pkt; IF₂₀₂₁ 3,998)

**Autor korespondencyjny*

Łączna punktacja czterech oryginalnych prac, wchodzących w skład jednotematycznego cyklu publikacji, zgodnie z rokiem opublikowania w czasopiśmie indeksowanych w bazie Journal Citation Reports (JCR) wynosi:

- według listy czasopism punktowanych MNiSW – **360 punktów**,
- łączny współczynnik oddziaływania, Impact factor (IF) – **14,773**

4.3. Opis osiągnięcia i wyniki

Wprowadzenie

Choroby ośrodkowego układu nerwowego są uważane za jedno z najczęstszych schorzeń cywilizacyjnych na świecie, prowadzących do głębokiego kalectwa, a często szybkiej śmierci. Mimo rosnącej zachorowalności, mechanizmy leżące u podstaw oraz możliwości leczenia schorzeń takich jak stwardnienie zanikowe boczne (SLA), stwardnienie rozsiane (SM), Choroba Alzheimera, Parkinsona czy udaru niedokrwinnego są nadal słabo poznane. Wynika to zarówno z różnic w przebiegu wymienionych schorzeń, mnogości przyczyn etiologicznych,

takich jak czynniki środowiskowe, genetyczne, immunologiczne jak również braku odpowiednich modeli zwierzęcych, które umożliwiłyby rzetelne przełożenie wyników badań ze zwierząt na człowieka. Zwierzęce modele chorób neurodegeneracyjnych sięgają ponad 30 lat¹. Większość z nich stanowią modele oparte na gryzoniach, z uwagi na łatwość indukcji, aspekt finansowy czy stosunkowo krótki czas potrzebny na ich wygenerowanie i optymalizację. Mimo, iż stanowią one wartościową i opłacalną strategię badań przeciwoowych, bezpośrednie przełożenie wyników badań uzyskanych na małych zwierzętach na ludzi doprowadziło do wielu nieudanych prób klinicznych. Potrzeba modelowania chorób neurodegeneracyjnych u dużych zwierząt wynika z dramatycznych różnic w rozmiarze, anatomii i fizjologii mózgu, a także układzie immunologicznym między człowiekiem a gryzoniami²⁻³. Ponadto stosowanie modeli chorób neurodegeneracyjnych, opartych na gryzoniach do badania takich zaburzeń neurologicznych, jak zaburzenia motoryczne czy zdolności poznawcze jest wysoce wątpliwe z uwagi na różnice w rozwoju mózgu, gęstości neuronalnej, stosunku istoty szarej do białej czy stopniu pofałdowania kory mózgowej^{4,5}. Kolejnym istotnym elementem dyskredytującym użycie gryzoni do modelowania postępujących chorób OUN jest ich długość życia. W przeciwieństwie do nich, duże zwierzęta, takie jak naczelnne, psy czy świnię żyją stosunkowo długo, a współdzielenie przez nie tego samego środowiska, co człowiek znacznie zwiększa możliwość porównania przebiegu choroby czy efektywności terapii. Duży rozmiar mózgu oraz podobieństwo unaczynienia u zwierząt takich jak naczelnne, psy czy świnię umożliwiają także zastosowanie materiałów, narzędzi i sprzętu oraz diagnostyki klinicznej stosowanej u człowieka. Naczelnne są z pewnością najodpowiedniejszym gatunkiem do modelowania i badań chorób układu nerwowego człowieka, jednak z uwagi na kontrowersje etyczne i decyzję Parlamentu Europejskiego w sprawie ochrony zwierząt stosowanych do celów naukowych 2008/0211 (COD), zainteresowanie tym gatunkiem znacznie spadło. Innym przykładem są psy, które są ewolucyjnie i genetycznie bliskie człowiekowi, a mnogość chorób, zbliżonych do tych, występujących u człowieka sprawia, iż ten gatunek ma ogromną wartość jako model zwierzęcy. Od kilkunastu lat, choroby naturalnie występujące u psów, jak choroby nowotworowe⁶, mielopatia degeneracyjna (MD)^{7,8}, zaburzenia układu oddechowego^{9,10} czy endokrynologicznego¹¹ stanowią doskonałe modele odpowiadających im chorób człowieka. Psy są wyjątkowymi modelami nowotworów, w szczególności złośliwych, ponieważ w naturalny sposób rozwijają się u nich te same typy raka, co u człowieka¹². Morfologia i histologia, a często także odpowiedź na leczenie nowotworów u psów jest bardzo podobna do tych u człowieka¹³. Kolejnym przykładem jest naturalnie, spontanicznie występująca mielopatia degeneracyjna, która swą etiologią, przebiegiem i objawami bardzo

przypomina stwardnienie zanikowe boczne u człowieka. W przypadku obu chorób dochodzi do degeneracji neuronów ruchowych, ograniczenia dostaw energii do neuronów i utraty mieliny, czego konsekwencją jest atrofia mięśni i śmierć. Z uwagi na fakt, iż wymiana neuronów, a w szczególności degenerujących neuronów ruchowych jest problematyczna, a często wręcz niemożliwa, nadzieję na przywrócenie prawidłowych funkcji neuronów niesie przeszczep komórek macierzystych w miejsca objęte schorzeniem. Terapie przedkliniczne oparte na przeszczepach komórek macierzystych w ALS zostały zbadane głównie na modelach gryzoni. Wobec pozytywnych efektów zastosowania komórek macierzystych u transgenicznych myszy^{14,15}, podjęłam się badań nad skutecznością i bezpieczeństwem zastosowania terapii opartej na prekursorach glejowych oraz mezenchymalnych komórkach macierzystych u psów z MD, które stały się przedmiotem części prezentowanego osiągnięcia naukowego.

Rekrutacja zwierząt towarzyszących jest jednak bardzo trudna i czasochłonna i nierzadko wiąże się z wysokimi kosztami badań przesiewowych, mających na celu weryfikację występowania choroby. W przeciwieństwie do naczelnych i psów, świnia jest zwierzęciem hodowanym do celów żywieniowych i tym samym znacznie lepiej akceptowanym przez społeczeństwo jako model doświadczalny. Ponadto, mózg świni jest podobny do ludzkiego. Wysoki stopień pofałdowania, identyczny stosunek substancji białej do szarej oraz fakt, iż mózg świni jest jedynie 10 razy mniejszy, czyni ten gatunek bardzo atrakcyjnym, szczególnie w kontekście modelowania chorób neurodegeneracyjnych. Świnie wykorzystywane są jako modele zwierzęce dla różnych chorób człowieka, w tym infekcji¹⁶, zaburzeń metabolicznych^{17,18} czy nowotworów mózgu¹⁹. Wciąż jednak niewiele jest danych na temat modeli udaru niedokrwinnego u świni czy chorób demielinizacyjnych. Poza oczywistym, czyli anatomią i unaczynieniem mózgu w przypadku modelowania obu tych schorzeń niezwykle ważny jest także układ immunologiczny, który zarówno w udarze jak i SM odgrywa istotną, często nadrzędną rolę w przebiegu choroby. Leczenie udaru niedokrwinnego jest ogromnym wyzwaniem, z uwagi na wąskie okno terapeutyczne – czas, w trakcie którego można zastosować leczenie, a także niejednoznaczne, często nierozpoznawalne przez otoczenie objawy przejścia choroby. Rozmiar i lokalizacja zawału determinują przeżycie pacjenta, a także stopień niepełnosprawności²⁰. Jak wykazano, wystąpienie udaru znacznie zaburza funkcjonowanie układu immunologicznego, a jednocześnie, w miejscu zawału rozwija się stan zapalny, przyspieszający degenerację tkanki mózgu²¹. Z kolei zarówno rozwój jak i przebieg SM jest ściśle skorelowany z układem immunologicznym, przez indukowaną różnymi czynnikami jego autoagresję²². Wobec tego modelowanie obu tych schorzeń bez zastosowania

podobieństwa układu immunologicznego może wiązać się z niepełnym obrazem choroby, a tym samym negatywnie wpływać na wyniki ewentualnych terapii. Układ odpornościowy świni w 80% badanych czynników przypomina ludzki, co w porównaniu z gryzoniami (10%) daje ogromną przewagę. Wobec powyższych, w pozostałej części prezentowanego osiągnięcia naukowego, przeprowadziłam badania nad indukcją modelu udaru niedokrwinnego oraz miejscowej demielinizacji u świni domowej.

Cele i zadania

1. Indukcja modelu udaru niedokrwinnego u świni domowej (Publikacja 1).
2. Indukcja modelu stwardnienia rozsianego u świni domowej (Publikacja 2).
3. Modelowanie opieki terapeutycznych z wykorzystaniem komórek macierzystych w leczeniu stwardnienia zanikowego bocznego u psów (Publikacje 3 i 4).
 - a. Zbadanie efektywności i bezpieczeństwa transplantacji komórek macierzystych drogą dooponową u psów chorych na mielopatię degeneracyjną (Publikacja 3).
 - b. Zbadanie efektywności i bezpieczeństwa transplantacji komórek macierzystych drogą dotętniczą u psów chorych na mielopatię degeneracyjną (Publikacja 4).

Indukcja modelu udaru niedokrwinnego u świni domowej (Praca nr 1)

Udar niedokrwiny to trzecia najczęstsza przyczyna zgonów i główna przyczyna długotrwałej ciężkiej niepełnosprawności u dorosłych²³. Jedynym lekiem zatwierdzonym przez Agencję Żywności i Leków (FDA) do leczenia osób z udarem niedokrwinnym jest alteplaza (tPA). Zastosowanie tPA jest jednak obarczone wąskim oknem terapeutycznym podania (<4,5 godz.), co sprawia, że większość pacjentów nie kwalifikuje się do leczenia²⁴. Mechaniczna trombektomia u wybranych pacjentów znacznie wydłuża okno terapeutyczne do 24 godzin, co zwiększa liczbę pacjentów kwalifikujących się do terapii tPA²⁵, jednak niewielka ilość pacjentów kwalifikuje się do takiego zabiegu. Modelowanie udaru u zwierząt stanowi podstawę do badania chorób i opracowywania nowych terapii. Większość zwierzęcych modeli udaru stanowią gryzonie, lecz z uwagi na drastyczne różnice anatomiczne mózgowia, wciąż poszukuje się idealnego modelu opartego na dużych zwierzętach. Ze względu na podobieństwa w zakresie unaczynienia mózgu psy doskonale nadają się do modelowania udaru z wykorzystaniem podejścia wewnątrznaczyniowego²⁶, jednak z uwagi na fakt, że są one zwierzętami towarzyszącymi człowiekowi, ich wykorzystanie do modelowania takich schorzeń jest kontrowersyjne, a w wielu krajach eksperymenty z użyciem psów są zabronione. Świnia

domowa, z uwagi na mózg sporych rozmiarów oraz unaczynienie układu nerwowego podobne do człowieka stanowi bardzo dobry model chorób neurologicznych²⁷. Opracowane dotychczas modele udaru u dużych zwierząt były oparte na kraniotomii w celu uzyskania chirurgicznego dostępu do tętnicy środkowej mózgu (MCA), co jest wysoc inwazyjne i niesie wysokie ryzyko śmierci zwierzęcia²⁸. Wcześniejsze próby wywołania udaru u świń z wykorzystaniem dostępu wewnątrznacyniowego nie powiodły się z uwagi na złożoność układu naczyniowego mózgu oraz obecność sieci mikronaczyń - *rete mirabile*, oddzielających krążenie zewnątrzczaszkowe od wewnątrzczaszkowego. Obecność tej sieci uniemożliwia wprowadzenie cewnika dotętniczego do naczyń mózgowych w celu miejscowego zablokowania przepływu krwi w mózgu²⁹. Z uwagi na problematyczną anatomie układu naczyniowego mózgowia u świni, Ringer i współpracownicy podjęli próbę umieszczenia skrzepliny w tętnicy wstępującej gardła, jednak nie spowodowało to niedokrwienia mózgu³⁰. Przedstawiony przeze mnie model niedokrwicznego, wewnątrznacyniowego udaru u świń jest pierwszym zoptymalizowanym modelem udaru u dużych zwierząt i z powodzeniem może być wykorzystany do testowania terapii przedklinicznych.

Metodologia i wyniki

Do badań użyto dziewięciu świń rasy polska wicłka biała, które zostały podzielone na dwie grupy, w zależności od czasu uśmiercenia (7 dni i 3 miesiące). Za pomocą ultrasonografu zidentyfikowano tętnicę udową, po czym wprowadzono do niej osłonkę cewnika wprowadzającego (5F, Terumo). Następnie, poprzez tętnicę wprowadzono mikrocewnik (UltraFlow HPC Flow Directed Micro Catheter, ev3) najpierw do łuku aorty, a następnie do tętnicy szyjnej wspólnej, proksymalnie do *rete mirabile*. W celu uniknięcia okluzji mikrocewnika, był on stale przepłukiwany solą fizjologiczną z dodatkiem heparyny. Następnie, w celu uwidocznienia dystrybucji, roztwór trombiny (Biomed, Polska) zmieszano ze środkiem kontrastowym i (1:20) wstrzyknięto dotętniczo przez mikrocewnik pod kontrolą rezonansu magnetycznego (RM). W celu potwierdzenia wywołania udaru zwierzęta skanowano w RM w dniach 1, 3, 7 oraz 1 miesiąc po procedurze. Procedura wywołania udaru trwająca około 3-4 godzin była początkowo dobrze tolerowana przez wszystkie dziewięć zwierząt. Trzy zwierzęta zdechły podczas ostrej fazy udaru, jedno podczas wprowadzania w stan znieczulenia do badania kontrolnego, a dwa 1 dzień po udarze. Na podstawie przeprowadzonej sekcji zwłok stwierdzono rozległe uszkodzenie mózgu. Cztery zwierzęta uśmiercono 6 dni po wywołaniu udaru, dwa dodatkowe uśmiercono trzy miesiące później. Zaobserwowano, że wszystkie zwierzęta, które przeżyły, poruszały się, mogły niezależnie pić i jeść, chociaż miały wyraźne

deficyty motoryczne w przeciwległych kończynach. Po wywołaniu udaru zaobserwowano także szybkie męczenie się zwierząt i apatię. Zwierzęta w sposób charakterystyczny przechylały głowę na bok, miały trudności z chodzeniem, były zdezorientowane, często wykazywały utratę równowagi i koordynacji. Na podstawie map ADC, uzyskanych w RM możliwe było wykrycie nawet niewielkich uszkodzeń niedokrwiennych. Pierwsze oznaki uszkodzenia niedokrwiennego w mięszu mózgu podczas dyfuzji wykryto 27 minut po dotętnicznej iniekcji trombiny z przyspieszeniem uszkodzenia obserwowanym między 16 a 27 minutą po indukcji skrzepu i ciągłym rozszerzaniem się obszaru udaru między 49 a 79 min. Po 2 godzinach od wywołania udaru nie zaobserwowano dodatkowych zmian w dyfuzji na mapach ADC. Po 24 godzinach obszar uszkodzenia odpowiadał obszarowi niedokrwienia, widocznemu po wstrzyknięciu trombiny, a jego średnia objętość wynosiła $7,39 \pm 5,41$ cm³. Na wczesnym etapie, po 24 godzinach od indukcji udaru wykazano jedynie marginalne wzmocnienie w sekwencji T1 z kontrastem w RM, co wskazywało prawdopodobnie na zachowanie szczelności bariery krew mózg (BBB) lub ograniczenie przenikania środka kontrastowego. W fazie przewlekłej, miesiąc po wywołaniu udaru, doszło do wyraźnego zaniku tkanki mózgowej z widoczną hiperintensywnością w sekwencji T2 w RM. Dzięki obrazowaniu T1 z kontrastem zaobserwowano utrzymujące się otwarcie BBB w różnych regionach mózgu. Lokalizację i wielkość obszaru objętego udarem widoczne na skanach RM potwierdzono za pomocą barwienia histologicznego hematoksyliną i eozyną (HE). Na podstawie barwień przeciwko immunoglobulinie świńskiej, zaobserwowano przerwanie BBB w ostrej fazie u świń, które zdechły wkrótce po zabiegu, po 6 dniach od zabiegu, a nawet po 90 dniach po udarze. W celu oceny ogólnoustrojowego efektu dotętnicznego wstrzyknięcia trombiny, monitorowano także czas trombinowy w próbkach krwi. Zaobserwowano wydłużenie czasu trombinowego od wartości wyjściowej ($25,36 \pm 7,623$ s) do $41,80 \pm 8,15$ s po zabiegu, jednak po 5 dniu od zabiegu, czas trombinowy zaczął się zmniejszać ($35,26 \pm 8,17$ s), a po 26 dniach powrócił do poziomu wyjściowego.

Wnioski

W przedstawionych badaniach po raz pierwszy dowiedziono o wykonalności indukcji modelu udaru metodą wewnątrznaczyniową u świń. Dzięki monitorowaniu zabiegu w RM, byłam w stanie zaobserwować tworzenie się skrzepów wywołanych trombiną i wynikającą z tego blokadę perfuzji mózgowej i w konsekwencji uszkodzenie po udarze w czasie rzeczywistym. Przedstawiony model charakteryzowała stosunkowo duża objętość zawału obejmująca większość terytorium MCA. Dzięki zastosowaniu innowacyjnych technik udało się

stworzyć nowy model udaru niedokrwinnego świń o dużym znaczeniu klinicznym. Model może stanowić znaczny wkład w badania mające na celu zrozumienie patofizjologii udaru, a przede wszystkim opracowanie nowych terapii.

Indukcja modelu demielinizacji u świni domowej (Praca nr 2)

Choroby demielinizacyjne ośrodkowego układu nerwowego, takie jak stwardnienie rozsiane (SM)³¹ lub poprzeczne zapalenie rdzenia kręgowego³², są wyniszczającymi schorzeniami, na które wciąż nie ma lekarstwa. Rozkład zmian demielinizacyjnych w SM jest zmienny, z częstym zajęciem nerwu wzrokowego, rdzenia kręgowego, okołokomorowej istoty białej, czy pnia mózgu i mózdzku³³. Wciąż jednak nie udało się stworzyć terapii, która umożliwiłaby przywrócenie funkcji uszkodzonych obszarów istoty białej i wyeliminowała długoterminowe skutki nawrotów choroby. Obecnie, najczęściej stosowanym modelem zwierzęcym stwardnienia rozsianego jest autoimmunologiczne zapalenie mózgu i rdzenia (EAE). Niestety, z uwagi na bardzo istotny klinicznie patomechanizm demielinizacji, model ten ma kilka istotnych wad, w tym niedostateczną ilość zmian obecnych w mózgu czy nieprzewidywalną i zmienną lokalizację lezji. W związku z tym istnieje duże zapotrzebowanie na tworzenie nowych modeli demielinizacyjnych, w których zmiany mogą być zlokalizowane w pożądanej strukturze, a ich rozmiar może być przewidziany i w pełni kontrolowany. Modele oparte na ogniskowej demielinizacji są zazwyczaj wywoływane przez śródmiąższowe wstrzyknięcia gliotoksyn^{34,35}, takich jak lizolecytyna (lizofosfatydylocholina, LPC)³⁶ czy bromek etydyny (EtBr)³⁷. Mimo znacznej ilości modeli demielinizacji na małych zwierzętach, istnieje ogromna potrzeba stworzenia i optymalizacji modeli ogniskowej demielinizacji na zwierzętach o anatomii układu nerwowego oraz immunologii bardziej zbliżonej do człowieka. Stosunek istoty białej do szarej w mózgu świni jest porównywalny z tym u człowieka, wobec czego gatunek ten zdaje się być odpowiedni do modelowania SM. W poniższych badaniach zastosowano innowacyjną metodę, opracowaną w celu ułatwienia i poprawy skuteczności ukierunkowanego wstrzyknięcia do miąższu mózgu - dostarczania substancji wzmocnionego konwekcją (CED). Technikę CED zastosowano wielokrotnie zarówno w modelach przedklinicznych, do testowania związków biochemicznych^{38,39}, a także u pacjentów z guzami mózgu⁴⁰. Dzięki niskiej prędkości przepływu administrowanego środka potencjalne uszkodzenia tkanki są minimalizowane, a składniki aktywne mogą być równomiernie dystrybuowane⁴¹ podczas iniekcji śródmiąższowych⁴². Dodatkowym atutem, zastosowanym w przedstawionych badaniach jest także możliwość monitorowania podania pożądanej substancji pod kontrolą RM⁴³, co umożliwi śledzenie dystrybucji wstrzykiwanej substancji

w czasie rzeczywistym⁴⁴. Przedstawiony przeze mnie model stanowi zoptymalizowany model ogniskowej demielinizacji u dużych zwierząt o dużym znaczeniu klinicznym, który może mieć zastosowanie w testowaniu terapii chorób demielinizacyjnych na poziomie przedklinicznym.

Metodologia i wyniki

Do badań użyto ośmiu świń rasy polska wielka biała. W celu wprowadzenia urządzenia ClearPoint SmartFrame (MRI Interventions, Irvine, Kalifornia, USA), do wykonania CED, na skórze czaszki wykonano nacięcie, po czym wywiercono dziurę o średnicy 3 mm. Urządzenie zostało zamocowane na czaszce za pomocą tytanowych śrub. Cewnik SmartFlow (MRI Interventions) wypełniono gliotoksyną (lizolecytyną – LPC lub i bromkiem etydydny - EtBr) i zamontowano w SmartFrame. Roztwór gliotoksyny wlewano z szybkością 250 μ l/h pod kontrolą RM. Podczas jednogodzinnej infuzji podano 250 μ l gliotoksyny. W celu analizy obecności i wielkości lezji, zwierzęta skanowano w RM podczas podania, 3 oraz 7 dni po indukcji demielinizacji. W celu zbadania optymalnego stężenia bromku etydydny do wywoływania ogniskowej demielinizacji, wykonano podania trzech różnych stężeń tej gliotoksyny: 0,0125; 0,05; i 0,2 mg/ml. Wykazano, iż dawka 0,2 mg/ml EtBr spowodowała ewidentne uszkodzenie naczyń i krwotok, o czym świadczyła hipointensywność w skanach RM, w sekwencji T2. Dawka 0,0125 mg/ml miała niewielki wpływ na indukcję zmiany demielinizacyjnej, natomiast po podaży dawki 0,05 mg/ml EtBr zaobserwowano wyraźnie widoczne zmiany demielinizacyjne bez krwotoku. W celu potwierdzenia indukcji zmian demielinizacyjnych, wykonano analizę histopatologiczną. Dzięki barwieniu mieliny roztworem criochromu potwierdzono lezje obecne na skanach RM. Subtelne zmiany w tkance mózgowej zaobserwowano przy dawce 0,0125 mg/ml, rozległą demielinizację przy zastosowaniu 0,05 mg/ml oraz rozległe uszkodzenie tkanki przy dawce 0,2 mg/ml. Co ciekawe, dawka 0,05 mg/ml EtBr skutkowała zmniejszoną gęstością aksonów, ale także immunoreaktywnością neurofilamentów w centrach uszkodzeń, wskazującą na przeżycie α demielinizowanych aksonów. W przypadku podaży LPC wykazano, iż jej wpływ na istotę białą świń zależy od stężenia. Za pomocą RM oraz analizy histopatologicznej wykazano, że podanie LPC w dawce 20 i 30 mg/ml spowodowało hiperintensywność w sekwencji T2 w RM, co wskazywało na obecność procesu zapalnego lub demielinizację. Podczas barwienia histologicznego mieliny przy użyciu criochromu wykazano jednak, iż dawka 20 mg/ml LPC spowodowała tylko częściową utratę mieliny, natomiast przy dawce 30 mg/ml zmiany były bardziej wyraźne. Dzięki barwieniu immunohistochemicznemu w kierunku IBA-1 wykazano rozległą aktywację mikrogleju w grupie α podaży 30 mg/ml, przy jednoczesnej niewielkiej utracie aksonów, o czym

świadczyło pozytywne barwienie neurofilamentów. W obu grupach poddanych iniekcji LPC architektura tkanki była dobrze zachowana, bez objawów krwotoku, co wskazywało na fakt, iż LPC jest lepszą gliotoksyną do indukcji zmian demielinizacyjnych u świń.

Wnioski

Podsumowując, dostarczanie wspomaganie konwekcją, w połączeniu z podglądem obrazu pod kontrolą RM w czasie rzeczywistym, jest doskonałym narzędziem do indukcji modelu ogniskowej demielinizacji u świń. Obie gliotoksyny – lizolecytyna i EtBr były w pełni skuteczne w wywołaniu ogniskowej demielinizacji w mózgu świń. Zastosowanie LPC skutkowało lepszym zachowaniem architektury tkankowej i mniejszym stanem zapalnym, co może być lepszą strategią modelowania SM. Model ten może stać się bardzo przydatny do testowania nowych strategii terapeutycznych, w tym opartych na przeszczepie komórek macierzystych.

Modelowanie opcji terapeutycznych w leczeniu SLA boczno u psów (Publikacje 3 i 4)

Miętotapia degeneracyjna, występująca naturalnie u psów jest idealnym modelem do badań nad SLA. Z uwagi na degenerację neuronów ruchowych oraz niemożność ich przeszczepienia, obiecującą opcją terapeutyczną jest transplantacja komórek wspierających ich funkcje, w celu zapobieżenia postępowi choroby. W zależności od umiejscowienia schorzenia oraz pochodzenia zmiany możliwe jest zastosowanie różnego rodzaju komórek macierzystych. Mniej zróżnicowane komórki, takie jak nerwowe komórki macierzyste (NSC), mają szersze możliwości różnicowania, jednak kosztem niskiej przewidywalności fenotypu, w jaki ostatecznie dojrzeją. Komórki bardziej zróżnicowane, jak prekursor neuronalny (NRP) lub glejowe (GRP), mają bardziej ograniczone możliwości różnicowania, ale przez to też większą przewidywalność fenotypu ich dojrzałych produktów⁴⁵. Wykazano, iż szczurze GRP, przeszczepione do rdzenia kręgowego dorosłych szczurów, przeżywały co najmniej 6 tygodni i ulegały różnicowaniu do astrocytów i oligodendrocytów. Ponadto komórki wykazywały zasiedlenie tkanki i migrację wzdłuż istoty białej, na odległość dalszą niż 15 mm w ciągu 6 tygodni⁴⁶. Podobnie, ludzkie GRP przeszczepione do uszkodzonego rdzenia kręgowego szczura charakteryzowała dobra żywotność, migracja przez tkankę rdzenia kręgowego, a także potencjał regeneracyjny^{34,47}. W związku z ogromnym potencjałem komórek GRP oraz ich zdolnością różnicowania do komórek glejowych zostały one wykorzystane w poniższych badaniach. Ponadto, zastosowano niezróżnicowane mezenchymalne komórki macierzyste.

Zbadanie efektywności i bezpieczeństwa transplantacji komórek macierzystych drogą dooponową u psów chorych na mielopatię degeneracyjną (publikacja 3)

Obecnie dominującą techniką opartą na podaży komórek macierzystych jest stereotaktyczne śródmiaższowe wstrzyknięcie, co z uwagi na rozsiany charakter schorzeń takich jak SM czy SLA wydaje się nieefektywne, gdyż do pokrycia całej objętości mózgu, która ma znaczenie dla osiągnięcia efektu terapeutycznego, potrzeba dziesiątek, a nawet setek miejsc wstrzyknięcia⁴⁸. Krążenie płynu mózgowo-rdzeniowego umożliwia rozprzestrzenianie przeszczepionych komórek w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) bez interwencji chirurgicznej. Dostęp do płynu mózgowo-rdzeniowego, a zwłaszcza przestrzeni wewnątrzoponowej, jest łatwy i minimalnie inwazyjny przez zastosowanie punkcji lędźwiowej. Zastosowanie tej drogi podania komórek zostało wielokrotnie zbadane na poziomie badań przedklinicznych⁴⁹ i klinicznych⁵⁰. Nie mniej jednak, nieprzewidywalność dystrybucji komórek w przestrzeni wypełnionej płynem z możliwością sedymentacji lub usunięcia z miejsca podania, utrudnia postęp w tej dziedzinie. Wymienione wyzwania mogą być zniwelowane przez wprowadzenie podaży komórek zabezpieczonych we wstrzykiwalnym hydrożelu, nie tylko wspierającym funkcje komórek, lecz także zapewniającym bezpieczne i precyzyjne umieszczenie transplantu na powierzchni rdzenia kręgowego. Liang i współpracownicy wykazali, że zastosowanie hydrożelu na bazie kwasu hialuronowego (HA) wspomagało przeżycie neuronalnych komórek macierzystych po przeszczepie, a jego właściwości biomechaniczne i dynamika żelowania ułatwiały jego wstrzykiwanie⁵¹. Założeniem badań i tym samym pierwszego podejścia terapeutycznego u psów z MD było, iż komórki macierzyste osadzone we wstrzykiwalnym hydrożelu pozostałyby w miejscu podania, a podany hydrożel wspierałby przeżycie i migrację komórek do mięszu rdzenia kręgowego. Ponadto, istotną kwestią było także zbadanie czy obecność hydrożelu i jego degradacja nie spowoduje zapalenia lub zablokowania krążenia płynu mózgowo-rdzeniowego (CSF).

Metodologia i wyniki

W celu optymalizacji procedury transplantacji i zbadania jej bezpieczeństwa, w pierwszej kolejności procedurę przeprowadzono na świniach. W tym celu osiem młodych świń domowych rasy polska wielka biała podzielono na dwie grupy. Świniom z grupy I przeszczepiono świńskie mezenchymalne komórki macierzyste, pochodzenia szpikowego (pBMMSC) zawieszony w zbuforowanej soli fizjologicznej (PBS), natomiast świniom z grupy II pBMMSC zabezpieczony w hydrożelu na bazie kwasu hialuronowego (HA). Komórki przeszczepiono do CSF przy użyciu cewnika kompatybilnego z MRI, wprowadzonego do

przestrzeni podoponowej piersiowego odcinka rdzenia kręgowego za pomocą punkcji lędźwiowej. W celu uwidocznienia w RM, komórki wyznakowano superparamagnetycznymi nanocząsteczkami żelaza (SPION). Dzięki obrazowaniu RM przy użyciu sekwencji dynamicznych podczas transplantacji, możliwa była obserwacja pBMMSC podczas stopniowego rozprzestrzeniania się ich w płynie mózgowo-rdzeniowym. Sygnał pBMMSC zawieszonych w PBS (grupa I), zarejestrowany w RM był znacznie niższy w porównaniu z sygnałem komórek osadzonych w hydrożelu (grupa II). Przypuszcza się, iż było to spowodowane rozproszeniem komórek w CSF. Maksymalna powierzchnia tkanki rdzenia kręgowego, na której potwierdzono sygnał komórek zawieszonych w PBS wynosiła jedynie 0,25 cm, podczas gdy powierzchnia, jaką pokryły komórki zawieszane w hydrożelu wynosiła do 12,0 cm. W wyniku potwierdzenia efektywności i bezpieczeństwa procedury przeszczepu komórek zawieszonych w hydrożelu u świń, podjęto się transplantacji komórek u psów chorych na MD. Badaniom poddano pięć dorosłych psów (5–12 lat), różnych ras (3 owczarki niemieckie, 2 hovawarty), u których MD potwierdzono poprzez wykonanie badań genetycznych w kierunku mutacji w genie SOD1. Ze względu na zwyrodnienia kręgosłupa lędźwiowego, często występujące u psów powyżej 7 roku życia, transplantacja dokanałowa nie należy do prostych, co w tym przypadku udało się z powodzeniem wykonać. Psie progenitory glejowe (cGRPs), wyznakowane SPION, zostały zabezpieczone w hydrożelu na bazie IIA - Heprasil® tuż przed rozpoczęciem procedury. Dzięki obrazowaniu dynamicznemu RM podczas iniekcji hydrożelu zaobserwowano hipointensywność w okolicy końcówki cewnika rozszerzającą się w odcinku piersiowym rdzenia kręgowego. Odległość od czoła do ogona, pokryta preparatem komórkowo-hydrożelowym, wahała się od 4,2 do 25 cm. Hydrożel rozprzestrzeniający się w CSF i utrzymujący się w przestrzeni wewnątrzoponowej był widoczny w badaniu RM przez cały czas obrazowania. Analiza wykresów intensywności sygnału uzyskanych podczas przeszczepu cGRP wykazała, że wielkość regionów hipointensywnych rosła w czasie i osiągała plateau bez późniejszej redukcji, co potwierdza, że kompozyty komórkowo-hydrożelowe pozostały na miejscu po przeszczepie.

W celu analizy tkanek rdzeni psów, które zostały uśpione na skutek postępu choroby wykonano *ex vivo* RM oraz barwienia histologiczne. Na podstawie obserwacji skanów tkanki rdzenia kręgowego psów w sekwencji T2, wykazano hipointensywny sygnał w obszarze odpowiadającym regionowi widocznemu podczas procedury przeszczepu cGRP. Ponadto, na podstawie analizy histopatologicznej potwierdzono wyniki badań RM. Wykonanie barwienia HE uwidocznilo hydrożel otaczający tkankę rdzenia kręgowego w obszarach hipointensywnych widocznych na RM. W celu zbadania odpowiedzi zapalnej w tkance rdzenia w pobliżu

przeszczepu, wykonano barwienia immunofluorescencyjne w kierunku IBA-1 dla aktywowanego mikrogleju/makrofażów oraz glicynowego kwaśnego białka fibrylarnego - GFAP. Jako kontrolę zastosowano tkanki zdrowych psów oraz tkanki psów chorych na MD, nie poddanych transplantacji. Wykazano znaczący wzrost immunoreaktywności IBA-1 u psów z MD nie poddanych leczeniu, w porównaniu z kontrolą. U psów poddanych transplantacji cGRP ekspresja IBA-1 była na poziomie psów z MD nie poddanych leczeniu. Wyższą astrocytozę wykryto w istocie białej oraz szarej tkanki rdzenia kręgowego psów z MD, zarówno leczonych jak i nieleczonych zwierząt w porównaniu z psami kontrolnymi. Wstrzyknięcie biomateriałów do przestrzeni dokanałowej stwarza także ryzyko zablokowania krążenia CSF. W celu sprawdzenia, takiego ryzyka, zmierzyłam przestrzeń wewnątrzoponową, widoczną na skanach RM przed i po przeszczepie. Nie stwierdziłam poszerzenia przestrzeni wewnątrzoponowej na żadnym poziomie rdzenia kręgowego zarówno przed jak i po przeszczepie.

Wnioski

Ważnym aspektem transplantacji komórek jest zasiedlenie przez nie docelowej tkanki, objętej schorzeniem. W przedstawionym badaniu wykazałam, że hydrożel zastosowany do zabezpieczenia komórek podczas transplantacji umożliwia ich pozostanie w miejscu podania, stanowiąc jednocześnie ich ochronę przed odrzuceniem przeszczepu ze strony biorcy. Na podstawie pomiarów przestrzeni wewnątrzoponowej w oparciu o skany RM nie zaobserwowałam dowodów na blokadę krążenia płynu mózgowo-rdzeniowego. Ponadto, przy pomocy barwień tkanki rdzenia w kierunku czynników zapalnych nie wykazałam ich wzrostu w tkankach zwierząt po przeszczepie. Obie wymienione kwestie potwierdzają bezpieczeństwo zastosowania hydrożelu do transplantacji komórek macierzystych i samą procedurę przeszczepu dooponowego podania transplantu.

Transplantacja komórek macierzystych drogą dotętniczną u psów chorych na mielopatię degeneracyjną (publikacja 4)

Przyпуска się, iż przyczyną niezadawalającego efektu terapeutycznego transplantacji komórek macierzystych w leczeniu chorób neurologicznych lub neurodegeneracyjnych jest nieodpowiednie ich dostarczanie. Istnieje kilka możliwości podaży terapeutyków do mózgu, ale najczęstszą drogą podawania jest wlew dożylny (i.v.)^{52,53}. Mimo iż transplantacja drogą dożylną jest łatwa do wykonania, nieinwazyjna i bezpieczna, komórki podane w ten sposób wykazują niskie zasiedlenie tkanki mózgowia⁵⁴. W celu polepszenia efektu transplantacji, poza drogą i.v. zaczęto także wykorzystywać drogę dotętniczną (i.a.). W ciągu ostatniej dekady

dokonano znacznego postępu w zakresie ukierunkowanego dostarczania środków terapeutycznych właśnie tą drogą do wybranego obszaru mózgu z dużą dokładnością i powtarzalnością. Jedynie poprzez transplantację drogą i.a., terapeutyki mogą być rozprowadzane w wysokich stężeniach, równomiernie na docelowym obszarze mózgu i przy minimalnej ekspozycji ogólnoustrojowej⁵⁵. Zastosowanie modelu dużych zwierząt do zbadania efektywności i bezpieczeństwa procedur dotętnicznych było kluczowe, z uwagi na rozmiar mózgowia, zbliżony do mózgu człowieka. Unaczynienie mózgu psa umożliwia wprowadzenie cewników i.a. w kierunku dystalnych naczyń mózgowych i ukierunkowane dostarczanie komórek macierzystych pod kontrolą sprzętu do obrazowania klinicznego, co dodatkowo poprawia znaczenie kliniczne testowanych podejść terapeutycznych.

Metodologia i wyniki

W pierwszej kolejności, psy chore na MD poddano transplantacji domózgowej komórek cGRP wyznakowanych SPION. Trzem psom cierpiącym na MD (1 owczarek niemiecki, 2 howawarty) wprowadzono przez tętnicę udową cewnik nawigujący, po czym poprowadzono go do tętnicy szyjnej przy użyciu fluoroskopii. Następnie, do środkowej tętnicy mózgowej wprowadzony został mikrocewnik. Przed przeszczepieniem komórek obszar perfuzji wizualizowano przez dotętnicze wstrzyknięcie kontrastu z obecnością żelaza - Feraheme (AMAG pharms, Waltham, USA), przez cewnik a szybkość wlewu dostosowano tak, aby uzyskać odpowiednie pokrycie całej półkuli ipsilateralnej. Podczas transplantacji cGRP zaobserwowano zmianę intensywności sygnału w korze ipsilateralnej, co wskazywało, iż wyznakowane komórki dostały się do krążenia korowego. Przy pomocy analizy ilościowej skanów RM wykazano, że maksymalny sygnał pochodzący z komórek widoczny był pod koniec transplantacji, jednak po jej zakończeniu uległ znacznemu osłabieniu, co sugerowało, że komórki nie zostały wychwycone przez śródbłonek mózgu i poddane perfuzji. Obszar mózgu objęty hipointensywnym sygnałem wskazującym na lokalizację komórek cGRP w trakcie i po przeszczepie wynosił odpowiednio $7,02 \pm 0,39 \text{ cm}^2$ i $2,27 \pm 2,04 \text{ cm}^2$, co potwierdza, że obszar mózgu pokryty komórkami zmniejszył się o 74,11%. Wobec słabego zasiedlenia tkanki mózgowej przez komórki cGRP, przystąpiono do transplantacji psich komórek mezenchymalnych (cMSC), które są uważane za lepiej zasiedlające tkanki po przeszczepie. Transplantacja MSC, z uwagi na ich rozmiar może się jednak wiązać z powikłaniami mikroembolicznymi, stąd przed ich zastosowaniem u psów bezpieczeństwo procedury oraz wybranej dawki komórek przebadano na świniach. Na podstawie analizy dynamicznych skanów RM, wykazano, że hipointensywny sygnał świńskich MSC (pMSC) pod koniec wstrzyknięcia, wyrażony we względnej liczbie pikseli, zmniejszył

się jedynie o $31,25 \pm 2,10\%$ w porównaniu z wartością początkową. Wskazuje to na lepsze wychwytywanie komórek MSC przez śródbłonek w mózgu i efektywniejsze zasiedlanie tkanki mózgowej po przeszczepie dotętniczym. Na podstawie danych uzyskanych podczas transplantacji pMSC u świń przystąpiono do przeszczepu psich MSC u psów z MD. Psie MSC znakowane SPION wstrzyknięto z taką samą szybkością jak u świń pod kontrolą RM. Analiza skanów dynamicznych RM wykazała, iż komórki zajmowały $7,37 \pm 0,31 \text{ cm}^2$ półkuli podczas i $6,30 \pm 0,427 \text{ cm}^2$ pod koniec wstrzyknięcia, co oznacza, że procent komórek, które odpłynęły wraz z krążeniem po zakończeniu wstrzyknięcia wynosił jedynie 15%, co wskazuje, na fakt, iż cMSC były bardzo dobrze wychwytywane przez śródbłonek mózgu. Aby zbadać bezpieczeństwo przeszczepu, wykonano skany dyfuzyjne w RM, szczególnie skupiając się na regionach o wysokim poborze komórek. Nie zaobserwowano żadnych nieprawidłowości ogniskowych ani rozproszonych zarówno u świń po transplantacji pMSC jak i u psów po wstrzyknięciach cMSC. W celu zbadania, czy procedura przeszczepu nie doprowadziła do chronicznych defektów ogniskowych, takich jak atrofia mózgu, wykonano pomiary symetrii półkulistej i komorowej przed operacją i kilka miesięcy po transplantacji komórek. Nie wykryto statystycznie istotnych różnic w symetrii przed i po terapii z użyciem cGRP lub cMSC. Analiza histopatologiczna potwierdziła rozmieszczenie pMSC w mózgu świni, w regionach uwidoczniionych na skanach RM podczas przeszczepu. Barwienie przy użyciu błękitu pruskiego ułatwiło wykrycie SPION obecnych w pMSC w półkuli ipsilateralnej oraz brak komórek w półkuli przeciwległej. Starając się uzyskać wstępny pogląd na potencjalne efekty terapeutyczne, przeanalizowano ekspresję kilku genów, mających kluczowe znaczenie w kontekście funkcjonowania neuronów i gleju oraz procesów neurodegeneracyjnych w tkance mózgowej psów po transplantacji cMSC. U psów leczonych cMSC, zaobserwowano zmniejszoną ekspresję mRNA *IBA-1* i *GFAP* w półkuli ipsilateralnej, w porównaniu z półkulą kontralateralną (nieleczoną). Ekspresja mRNA *MCT2* była podwyższona w półkuli poddanej przeszczepowi cMSC, w porównaniu z półkulą nie przeszczepioną.

Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań wykazałam, że transplantacja komórek macierzystych drogą i.a. jest bezpieczna w przypadku obu typów komórek. Przeszczepienie komórek GRP u psów skutkowało niskim stopniem zasiedlenia tkanki mózgowej, przez co zastosowanie tego rodzaju komórek drogą dotętniczą powinno prawdopodobnie wiązać się ze wcześniejszą inżynierią komórkową i indukcją na ich powierzchni molekuł adhezyjnych, umożliwiających ich lepsze wychwytywanie przez komórki śródbłoneka naczyń mózgu. Przy transplantacji

komórek MSC wykazano ich doskonałą akumulację w mózgu. Zmiany w ekspresji IBA-1, GFAP oraz MCT2 po podaniu MSC wskazują na możliwy efekt terapeutyczny zastosowania tych komórek w leczeniu chorób o podłożu neurodegeneracyjnym. Ponadto, w wyniku zastosowania podania MSC drogą dotętniczą zarówno u świń jak i u psów potwierdzono bezpieczeństwo procedury, a skany RM z momentu podaży komórek oraz podczas kontroli w kolejnych odstępach czasu nie wykazały zmian w mózgu o charakterze zakrzepowym. Przedstawiona terapia może być obiecującym rozwiązaniem w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych, takich jak SLA, MS czy Choroba Parkinsona.

Podsumowanie badań

1. Z powodzeniem wyindukowano model wewnątrznaczyniowego udaru niedokrwiennego u świni. Model został kompleksowo scharakteryzowany i zwalidowany, wobec czego może stanowić obiecującą platformę do badań nad przebiegiem, immunologią udaru oraz opcjami terapeutycznymi w badaniach przedklinicznych.
2. Wykazano, że indukcja miejscowej demielinizacji w mózgu świni jest możliwa i powtarzalna za pomocą dwóch rodzajów gliotoksyn: bromku etydyny oraz lizolecytyny. Mniejsze uszkodzenia tkanki oraz obraz zmian podobny do tych występujących w przebiegu stwardnienia rozsianego u ludzi posiadały zwierzęta poddane lezji z użyciem LPC.
3. Wykazano bezpieczeństwo transplantacji komórek macierzystych drogą dooponową oraz dotętniczą u psów chorych na mielopatię degeneracyjną. Nie zaobserwowano zaburzeń krążenia płynu mózgowo-rdzeniowego w przypadku transplantacji prekursorów glejowych, zabezpieczonych w hydrożelu, ani zmian o charakterze zatorowym po dotętnicznym podaniu komórek GRP lub MSC u psów z MD.
4. Domózgowa transplantacja cMSC skutkowałą zmianą ekspresji genów odpowiedzialnych za odpowiedź zapalną (IBA-1, GFAP), co świadczy o immunomodulującym wpływie przeszczepionych komórek.

Literatura

1. Theuring, F., Thunecke, M., Kosciessa, U. & Turner, J.D. Transgenic animals as models of neurodegenerative diseases in humans. *Trends in biotechnology* **15**, 320-325 (1997).
2. Lorenzen, E., Follmann, F., Jungersen, G. & Agerholm, J.S. A review of the human vs. porcine female genital tract and associated immune system in the perspective of using minipigs as a model of human genital Chlamydia infection. *Vet Res* **46**, 116 (2015).
3. Whitelaw, C.B., Sheets, T.P., Lillico, S.G. & Telugu, B.P. Engineering large animal models of human disease. *The Journal of pathology* **238**, 247-256 (2016).
4. Morton, A.J. & Avanzo, L. Executive decision-making in the domestic sheep. *PloS one* **6**, e15752 (2011).

5. Grow, D.A., McCarrey, J.R. & Navara, C.S. Advantages of nonhuman primates as preclinical models for evaluating stem cell-based therapies for Parkinson's disease. *Stem cell research* **17**, 352-366 (2016).
6. Rowell, J.L., McCarthy, D.O. & Alvarez, C.E. Dog models of naturally occurring cancer. *Trends in molecular medicine* **17**, 380-388 (2011).
7. Golubczyk, D., et al. The Role of Glia in Canine Degenerative Myelopathy: Relevance to Human Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Molecular neurobiology* **56**, 5740-5748 (2019).
8. Coates, J.R. & Winger, F.A. Canine Degenerative Myelopathy. *Vet Clin N Am-Small* **40**, 929-+ (2010).
9. Chapman, R.W. Canine models of asthma and COPD. *Pulm Pharmacol Ther* **21**, 731-742 (2008).
10. Tanner, L. & Single, A.B. Animal Models Reflecting Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Related Respiratory Disorders: Translating Pre-Clinical Data into Clinical Relevance. *J Innate Immun* **12**, 203-225 (2020).
11. Kooistra, H.S., Galac, S., Buijtels, J.J.C.W.M. & Meij, B.P. Endocrine Diseases in Animals. *Horm Res* **71**, 144-147 (2009).
12. Tamburini, B.A., et al. Gene Expression Profiles of Sporadic Canine Hemangiosarcoma Are Uniquely Associated with Breed. *PLoS one* **4**(2009).
13. Paoloni, M. & Khanna, C. Science and society - Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. *Nature Reviews Cancer* **8**, 147-156 (2008).
14. Lepore, A.C., et al. Human Glial-Restricted Progenitor Transplantation into Cervical Spinal Cord of the SOD1(G93A) Mouse Model of ALS. *PLoS one* **6**(2011).
15. Jin, Y., et al. Transplantation of Human Glial Restricted Progenitors and Derived Astrocytes into a Contusion Model of Spinal Cord Injury. *Journal of neurotrauma* **28**, 579-594 (2011).
16. Brea, D., et al. The pig as a model for investigating the role of neutrophil serine proteases in human inflammatory lung diseases. *Biochem J* **447**, 363-370 (2012).
17. Spurlock, M.F. & Gabler, N.K. The development of porcine models of obesity and the metabolic syndrome. *J Nutr* **138**, 397-402 (2008).
18. Mordes, J.P. & Rossini, A.A. Animal-Models of Diabetes. *Am J Med* **70**, 353-360 (1981).
19. Selek, I., et al. Imaging and histological characterization of a human brain xenograft in pig: The first induced glioma model in a large animal. *Journal of neuroscience methods* **221**, 159-165 (2014).
20. Vogelgesang, A., Becker, K.J. & Dressel, A. Immunological consequences of ischemic stroke. *Acta neurologica Scandinavica* **129**, 1-12 (2014).
21. Iadecola, C. & Anrather, J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nature medicine* **17**, 796-808 (2011).
22. Gandhi, R., Laroni, A. & Weiner, H.L. Role of the innate immune system in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology* **221**, 7-14 (2010).
23. Benjamin, E.J., et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* **135**, e146-e603 (2017).
24. Uszynski, M., Uszynski, W. & Kielkowski, A. Tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitors of types 1 and 2 in amniotic fluid before labour and after childbirth. *Gynecologic and obstetric investigation* **39**, 93-96 (1995).
25. Goyal, M., et al. Endovascular thrombectomy after large-vessel ischaemic stroke: a meta-analysis of individual patient data from five randomised trials. *Lancet* **387**, 1723-1731 (2016).
26. Atchanceyasakul, K., et al. Large animal canine endovascular ischemic stroke models: A review. *Brain research bulletin* **127**, 134-140 (2016).
27. Felix, B., et al. Stereotaxic atlas of the pig brain. *Brain research bulletin* **49**, 1-137 (1999).

28. Platt, S.R., *et al.* Development and characterization of a Yucatan miniature biomedical pig permanent middle cerebral artery occlusion stroke model. *Experimental & translational stroke medicine* **6**, 5 (2014).
29. Burbridge, B., Matte, G. & Remedios, A. Complex intracranial arterial anatomy in swine is unsuitable for cerebral infarction projects. *Canadian Association of Radiologists journal = Journal l'Association canadienne des radiologistes* **55**, 326-329 (2004).
30. Ringer, A.J., Guterman, L.R. & Hopkins, L.N. Site-specific thromboembolism: a novel animal model for stroke. *AJNR. American journal of neuroradiology* **25**, 329-332 (2004).
31. Milo, R. & Miller, A. Revised diagnostic criteria of multiple sclerosis. *Autoimmun Rev* **13**, 518-524 (2014).
32. Kerr, D.A. & Ayetey, H. Immunopathogenesis of acute transverse myelitis. *Current opinion in neurology* **15**, 339-347 (2002).
33. Kalincik, T. Multiple Sclerosis Relapses: Epidemiology, Outcomes and Management. A Systematic Review. *Neuroepidemiology* **44**, 199-214 (2015).
34. Walczak, P., *et al.* Human glial-restricted progenitors survive, proliferate, and preserve electrophysiological function in rats with focal inflammatory spinal cord demyelination. *Glia* **59**, 499-510 (2011).
35. Rivers, T.M., Sprunt, D.H. & Berry, G.P. Observations on Attempts to Produce Acute Disseminated Encephalomyelitis in Monkeys. *The Journal of experimental medicine* **58**, 39-53 (1933).
36. Nichols, N.L., Punzo, A.M., Duncan, I.D., Mitchell, G.S. & Johnson, R.A. Cervical spinal demyelination with ethidium bromide impairs respiratory (phrenic) activity and forelimb motor behavior in rats. *Neuroscience* **229**, 77-87 (2013).
37. Hall, S.M. The effect of injections of lysophosphatidyl choline into white matter of the adult mouse spinal cord. *Journal of cell science* **10**, 535-546 (1972).
38. Holm, I.E., Alstrup, A.K. & Luo, Y. Genetically modified pig models for neurodegenerative disorders. *The Journal of pathology* **238**, 267-287 (2016).
39. Bobo, R.H., *et al.* Convection-enhanced delivery of macromolecules in the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 2076-2080 (1994).
40. Bankiewicz, K.S., *et al.* Convection-enhanced delivery of AAV vector in parkinsonian monkeys; in vivo detection of gene expression and restoration of dopaminergic function using pro-drug approach. *Experimental neurology* **164**, 2-14 (2000).
41. Sampson, J.H., *et al.* Comparison of intratumoral bolus injection and convection-enhanced delivery of radiolabeled antitenascin monoclonal antibodies. *Neurosurgical focus* **20**, E14 (2006).
42. Nduom, E.K., Walbridge, S. & Lonsler, R.R. Comparison of pulsed versus continuous convective flow for central nervous system tissue perfusion: laboratory investigation. *Journal of neurosurgery* **117**, 1150-1154 (2012).
43. Kantorovich, S., *et al.* Influence of neuropathology on convection-enhanced delivery in the rat hippocampus. *PloS one* **8**, e80606 (2013).
44. Yin, D., *et al.* Convection-enhanced delivery improves distribution and efficacy of tumor-selective retroviral replicating vectors in a rodent brain tumor model. *Cancer gene therapy* **20**, 336-341 (2013).
45. Gage, F.H. Mammalian neural stem cells. *Science* **287**, 1433-1438 (2000).
46. Han, S.S., Liu, Y., Tyler-Polsz, C., Rao, M.S. & Fischer, I. Transplantation of glial-restricted precursor cells into the adult spinal cord: survival, glial-specific differentiation, and preferential migration in white matter. *Glia* **45**, 1-16 (2004).
47. Haas, C. & Fischer, I. Human astrocytes derived from glial restricted progenitors support regeneration of the injured spinal cord. *Journal of neurotrauma* **30**, 1035-1052 (2013).

48. Bakshi, A., *et al.* Lumbar puncture delivery of bone marrow stromal cells in spinal cord contusion: a novel method for minimally invasive cell transplantation. *Journal of neurotrauma* **23**, 55-65 (2006).
49. Habisch, H.J., *et al.* Intrathecal application of neuroectodermally converted stem cells into a mouse model of ALS: limited intraparenchymal migration and survival narrows therapeutic effects. *Journal of neural transmission* **114**, 1395-1406 (2007).
50. Oh, K.W., *et al.* Phase I trial of repeated intrathecal autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in amyotrophic lateral sclerosis. *Stem cells translational medicine* **4**, 590-597 (2015).
51. Liang, Y., Walczak, P. & Bulte, J.W. The survival of engrafted neural stem cells within hyaluronic acid hydrogels. *Biomaterials* **34**, 5521-5529 (2013).
52. Kurtz, A. Mesenchymal stem cell delivery routes and fate. *International journal of stem cells* **1**, 1-7 (2008).
53. Labusca, L., Herea, D.D. & Mashayekhi, K. Stem cells as delivery vehicles for regenerative medicine-challenges and perspectives. *World journal of stem cells* **10**, 43-56 (2018).
54. Fischer, U.M., *et al.* Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first-pass effect. *Stem cells and development* **18**, 683-692 (2009).
55. Walczak, P., *et al.* Real-time MRI for precise and predictable intra-arterial stem cell delivery to the central nervous system. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **37**, 2346-2358 (2017).

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

5.1. Badania naukowe realizowane przed uzyskaniem stopnia doktora

Po uzyskaniu stopnia magistra biologii rozpoczęłam staż naukowy z zakresu biologii molekularnej w Zakładzie Mechanizmów Działania Hormonów, w Oddziale Biologii Rozrodu Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie, po czym swoją pracę w tym samym Zakładzie, kontynuowałam jako doktorantka. Podczas niemal pięcioletniej pracy uczestniczyłam w dwóch grantach mojej Promotorki Pani dr hab. Anety Andronowskiej, Prof. Agnieszki Blitek, Prof. Adama Zięcika oraz innych członków Zakładu. Warty podkreślenia jest jednak fakt, iż po dwóch latach badań mój autorski grant „Wpływ egzogennych gonadotropin na syntezę prostaglandyn w jajowodzie świni”, został sfinansowany przez Narodowe Centrum Nauki, którym kierowałam do 2016 roku. Celem moich badań realizowanych przed uzyskaniem stopnia doktora było określenie wpływu inseminacji oraz egzogennych hormonów gonadotropowych (hCG, eCG) na ekspresję i syntezę prostaglandyn i systemu VEGF w jajowodzie świni w okresie poowulacyjnym.

Metodologia i wyniki badań

Loszki dojrzałe płciowo podzielono na cztery grupy: loszki cykliczne, inseminowane, loszki o indukowanej owulacji oraz loszki superowulowane. Loszkom cyklicznym podawano 100 ml

sterylnego PBS, a pozostałe grupy loszek inseminowano 100 ml rozcieńczonego nasienia knura, 12 oraz 24 godz. po wykryciu trzeciej rui. W celu indukcji owulacji loszkom podawano 750 jednostek (IU) końskiej gonadotropiny kosmówkowej (eCG) oraz 500 IU ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (hCG) 72 h później. Natomiast loszkom przeznaczonym do superowulacji podawano 1500 IU eCG oraz 1000 IU hCG 72 h. Loszki stymulowane hCG/eCG poddano dwukrotnej inseminacji 24 i 48 godz. po podaniu hCG. Tkanki oraz krew zabezpieczono do badań trzy dni po inseminacji/owulacji, tuż po uboju zwierząt. Analizę ekspresji genów cyklooksyggenazy 2 (*PTGS2*), 9-ketoreduktazy prostaglandyny E₂ (*CBR1*), mikrosomalnej syntazy prostaglandyny E₂ (*mPGES-1*), syntazy prostaglandyny F_{2α} (*PGFS*), syntazy prostacykliny (*PGIS*) oraz jej receptora (*IP*), czynnika wzrostu śródbłonka naczyń (*VEGF*) VEGF₁₂₀, VEGF₁₆₄ oraz jego receptorów: Flt i KDR wykonano metodą Real-Time PCR, białka z wykorzystaniem metody Western blot, a lokalizację wymienionych czynników w tkance zbadano za pomocą barwień immunofluorescencyjnych oraz immunocytochemicznych. Zawartość PGE₂ i PGF_{2α} w tkankach jajowodu określono metodą radioimmunocenzymatyczną (RIA), a 6-keto PGF_{1α} metodą EIA. Stężenie E₂ i P₄ we krwi loszek określono za pomocą metody RIA.

Wykazano wzrost ekspresji mRNA *PTGS2* i *mPGES-1* oraz białka *mPGES-1* w cieżni i bańce jajowodu loszek inseminowanych oraz wzrost zawartości PGE₂ w cieżni jajowodu loszek inseminowanych. Zawartość 6-keto PGF_{1α} wzrosła w tkance bańki jajowodu loszek inseminowanych, co korelowało ze zwiększoną ekspresją mRNA receptora *IP*. Biorąc pod uwagę fakt, iż obie prostaglandyny są odpowiedzialne za regulację przepuszczalności naczyń krwionośnych oraz stymulację relaksacji jajowodu, ich zwiększona synteza w trzecim dniu po inseminacji może potwierdzać udział w syntezie i sekrecji płynu jajowodowego oraz zapewnieniu odpowiedniej amplitudy skurczów jajowodu.

Stymulacja z użyciem hCG i eCG znacząco zmieniła profil ekspresji genów i białka większości badanych czynników. Ekspresja mRNA *mPGES-1* uległa obniżeniu w obu częściach jajowodu na skutek zastosowania hCG/eCG, co korelowało z obniżoną zawartością PGE₂ w tkance jajowodu. W przeciwieństwie do PGE₂, odnotowano znaczący wzrost mRNA i białka *PGFS* i *CBR1* – enzymów odpowiedzialnych za syntezę PGF_{2α} w cieżni jajowodu, co skutkowało zwiększoną syntezą tej prostaglandyny w cieżni i bańce loszek stymulowanych hCG/eCG. Wynikiem obniżonej syntezy PGE₂ i jednoczesnego wzrostu produkcji PGF_{2α} była zmiana stosunku PGE₂:PGF_{2α} w obu częściach jajowodu loszek stymulowanych hCG/eCG. Indukcja owulacji oraz superowulacja miały także wpływ na syntezę PGI₂. Wykazano spadek koncentracji 6-keto PGF_{1α} w bańce loszek stymulowanych hCG/eCG oraz drastyczny spadek

poziomu białka receptora IP w bańce loszek z indukowaną owulacją, oraz cieśni i bańce loszek superowulowanych. Ekspresja mRNA obu izoform VEGF spadła w cieśni loszek superowulowanych. Z kolei poziom białka VEGF uległ obniżeniu w cieśni loszek obu grup stymulowanych hCG/eCG. Ekspresja mRNA *Flt-1* znacząco obniżyła się w jajowodach loszek z indukowaną owulacją oraz superowulowanych, przy czym poziom ekspresji mRNA *KDR* nie uległ zmianie na skutek stymulacji hCG/eCG. Poziom białka obu receptorów VEGF – Flt-1 oraz KDR uległ obniżeniu w bańce jajowodu loszek superowulowanych (Flt-1) oraz loszek o indukowanej owulacji. Stężenie hormonów steroidowych także uległo zmianie pod wpływem zastosowania hCG oraz eCG. Stężenie E_2 i P_4 było znacznie niższe we krwi loszek superowulowanych, w porównaniu z loszkami inseminowanymi.

Wnioski

Podsumowując, inseminacja wpłynęła na ekspresję genów, syntezę oraz sekrecję dwóch szczególnie ważnych prostaglandyn PGE_2 oraz PGI_2 , co potwierdza ich istotną rolę w procesach mających miejsce w jajowodzie w trzecim dniu po owulacji/inseminacji. Stymulacja z wykorzystaniem egzogennych gonadotropin spowodowała zmiany w syntezie zarówno prostaglandyn, jak i całego systemu VEGF. Badane czynniki odpowiadają za regulację wielu procesów fizjologicznych, począwszy od przepuszczalności naczyń krwionośnych po regulację amplitudy skurczów jajowodu. Zmieniona ekspresja i synteza wymienionych czynników może skutkować zaburzeniami w zapłodnieniu oraz wczesnym rozwoju i transporcie zarodka do macicy.

Poniżej przedstawiono publikacje z okresu przed uzyskaniem stopnia doktora:

- **I Malysz-Cymborska**, A J Ziecik, A Waclawik, A Andronowska, “Effect of hCG and eCG treatments on prostaglandins synthesis in the porcine oviduct”. *Reprod Domest Anim.* 2013 Dec;48(6):1034-42. (MNiSW₂₀₁₃, 30 pkt; IF₂₀₁₃ 1,177)
- **I Malysz-Cymborska**, A. Andronowska, “Expression of the vascular endothelial growth factor receptor system in porcine oviducts after induction of ovulation and superovulation” *Domest Anim Endocrinol.* 2014 Oct;49:86-95. (MNiSW₂₀₁₄, 30 pkt; IF₂₀₁₄ 2,171)
- **I. Malysz-Cymborska**, A. Andronowska. „Ovarian stimulation with human chorionic gonadotropin and equine chorionic gonadotropin affects prostacyclin and its receptor expression in the porcine oviduct”. *Domest Anim Endocrinol.* 2015 Oct;53:17-25. (MNiSW₂₀₁₅, 30 pkt; IF₂₀₁₅ 1,613)
- A. Blitek, M. Szymanska, E. Morawska-Pucinska, **I. Malysz-Cymborska**, A. Andronowska., “Prostacyclin receptor (PTGIR) in the porcine endometrium: Regulation of

expression and role in luminal epithelial and stromal cells". *Theriogenology*. 2015 Oct 1;84(6):969-82. (MNiSW₂₀₁₅, 30 pkt; IF₂₀₁₅ 1,838)

5.2. Badania naukowe realizowane po uzyskaniu stopnia doktora

5.2.1. Badania nad obecnością i rolą wybranych czynników w układzie rozrodczym samicy

a. Lokalizacja receptorów LH i FSH w jajowodzie świni oraz wpływ egzogennych gonadotropin na ich ekspresję

Po uzyskaniu stopnia doktora, w ramach posiadanego grantu podjęłam się określenia wpływu indukcji owulacji i superowulacji przy pomocy eCG i hCG na poziom ekspresji receptorów LH i FSH w jajowodzie świni w okresie poowulacyjnym. W doświadczeniu I loszki podzielono na grupy: cykliczną (kontrola; n = 5) i inseminowaną (n = 5). W eksperymencie II loszki podzielono na 3 grupy zwierząt: inseminowane (n = 5), z indukowaną owulacją/inseminowane (750 IU eCG, 500 IU hCG; n = 5) oraz superowulowane /inseminowane (1500 IU eCG, 1000 IU hCG; n = 5). Wykazano, iż sama inseminacja nie wpłynęła na poziom mRNA i białka LH/CGR. Miała ona jednak wpływ na ekspresję mRNA *FSHR* w cieśni i bańce jajowodu oraz obniżenie poziomu białka *FSHR* w cieśni jajowodu. Stymulacja hCG i eCG nie wpłynęła na ekspresję mRNA *LH/CGR* i *FSHR* w obu częściach jajowodu. Niemniej jednak superowulacja obniżyła poziom białka *LH/CGR* w bańce jajowodu w porównaniu z inseminowanymi loszkami. Podobnie, poziom białka *FSHR* w bańce jajowodu zmniejszył się po superowulacji. Komórki *LH/CGR*-dodatnie obserwowano w błonie śluzowej, a także w komórkach mięśni gładkich obu części jajowodu. W komórkach mięśni gładkich i naczyniach krwionośnych cieśni i bańki obserwowano komórki *FSHR*-pozytywne. W powyższych badaniach wykazałam po raz pierwszy, że stymulacja eCG i hCG, szczególnie w dużych dawkach, może zmieniać poziomy *LH/CGR* i *FSHR* w jajowodzie świni. To z kolei może zmienić wiele szlaków sygnałowych, np. prostaglandyn lub czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego, a w konsekwencji zaburzyć środowisko jajowodu i tym samym mieć negatywny wpływ na zapłodnienie i/lub rozwój embrionalny.

b. Obecność chemokin CC i ich rola w ciałku żółtym (CL) świni

W ramach wieloletniej współpracy z Zakładem Mechanizmów Działania Hormonów PAN w Olsztynie, miałam także okazję uczestniczyć w badaniach dotyczących analizy obecności i roli β -chemokin, zwanych także CC chemokinami w ciałku żółtym świni. Proces regresji lutealnej jest ściśle regulowany przez układ odpornościowy, a także chemokiny, odpowiedzialne głównie za aktywację i migrację komórek odpornościowych. Celem badań

było zbadanie profilu ekspresji i dystrybucji chemokin CC w CL świń podczas naturalnego cyklu rujowego i wczesnej ciąży. Dodatkowo badano wpływ $PGF_{2\alpha}$ na ekspresję wybranych chemokin oraz ich wpływ na komórki CL w warunkach *in vitro*. Wykazano, że poziomy ekspresji chemokin *CCL2*, *CCL4* i *CCL5* oraz receptora chemokin *CCR5* były zależne od dnia cyklu rujowego (niskie w 8-10 dniu i wysokie w 12-14 dniu cyklu rujowego). Ponadto poziomy ekspresji genów *CCL8* i *CCR2* były podwyższone w okresie luteolizy. W celu określenia lokalizacji *CCL2*, *CCL4*, *CCL5*, *CCR1*, *CCR2* i *CCR5* w CL świń cyklicznych oraz ciężarnych wykonano barwienia immunofluorescencyjne. Barwienie pozytywne dla wymienionych czynników potwierdzono głównie w komórkach lutealnych CL. Traktowanie komórek CL $PGF_{2\alpha}$ spowodowało zwiększoną ekspresję mRNA *CCL2* i *CCR1*. Inkubacja komórek CL *in vitro* w obecności *CCL2* powodowała zwiększenie ekspresji genów *BAX*, *BCL2* i *StAR*. Zastosowanie chemokiny *CCL4* do inkubacji z komórkami CL *in vitro* spowodowało zwiększenie ekspresji *StAR* i *HSD3-β1*. Natomiast inkubacja komórek CL z *CCL5* doprowadziła do zahamowania ekspresji genu *BAX*. Zróżnicowana przestrzenno-czasowa ekspresja *CCL2*, *CCL4*, *CCL5* i *CCR5* w całym cyklu rujowym oraz bezpośredni, ale nieprawidłowy wpływ wymienionych trzech chemokin na geny związane z apoptozą i syntezą progesteronu mogą wskazywać na skomplikowany i dwojaki udział tych czynników w regulacji luteolizy u świń.

W ramach powyższych badań opublikowano prace:

- **I. Małysz-Cymborska**, A. Andronowska. Downregulation of LH and FSH receptors after hCG and eCG treatments in the porcine oviduct. *Domest Anim Endocrinol.* 2016 Oct;57:48-54. (MNiSW₂₀₁₆, 30 pkt; IF₂₀₁₆ 1,644)
- K. J. Witck, Adam J. Ziecik, **I. Małysz-Cymborska**, A. Andronowska. The presence of CC chemokines and their aberrant role in the porcine corpus luteum. *Reprod Domest Anim.* 2020 May;55(5):632-646. (MNiSW₂₀₂₀, 100 pkt; IF₂₀₂₀ 1,641)

5.2.2. Modelowanie chorób neurologicznych u małych i dużych zwierząt

Głównym nurtem moich badań po uzyskaniu stopnia doktora i rozpoczęciu pracy w Katedrze Neurologii i Neurochirurgii Wydziału Lekarskiego UWM było i jest nadal modelowanie chorób neurologicznych i neurodegeneracyjnych u małych i dużych zwierząt. Mając możliwość uczestnictwa w wielu projektach o zasięgu międzynarodowym, w 2016 roku podjęłam współpracę z zespołem Prof. Walczaka na prestiżowym Uniwersytecie Johna Hopkinsa w Baltimore, w Stanach Zjednoczonych, wynikiem czego było opracowanie unikalnego modelu ludzkiego glejaka u królika. Na przełomie kwietnia i maja 2016 roku odbyłam także miesięczny staż z zakresu biologii komórki w Zakładzie Radiologii w Instytucie Inżynierii Komórkowej na Uniwersytecie Johna Hopkinsa. Podczas stażu miałam okazję zdobyć wiedzę

merytoryczną i praktyczną z zakresu izolacji progenitorów glejowych myszy, transplantacji i wizualizacji komórek macierzystych i nowotworowych przy użyciu bioluminescencji oraz hodowli komórkowej w systemie trójwymiarowym. W tym samym roku miałam szczęście podjąć współpracę z Panią dr Joan Coates z Uniwersytetu w Missouri. Dr Coates jest uznanym specjalistą z zakresu mielopatii degeneracyjnej u psów, wobec czego nasza współpraca obejmowała analizę przekazanych przez Uniwersytet w Missouri tkanek rdzeni psów chorych na MD i ich analizę pod kątem znaczenia gleju w patologii tej choroby. Na podstawie współpracy z oboma grupami opublikowałam dwie prace w renomowanych czasopismach zagranicznych.

a. Model ludzkiego guza mózgu u królika

Rokowanie w przypadku złośliwych guzów mózgu wciąż pozostaje złe pomimo połączenia resekcji nowotworu, radioterapii i chemioterapii. Mimo istnienia wielu modeli ludzkiego glejaka, opartych na gryzoniach, unaczynienie ich mózgowia stwarza problemy w zastosowaniu potencjalnych terapii opartych na podaży środków antynowotworowych wprost do tętnic mózgu, w celu lepszego zaopatrzenia chorego obszaru w terapeutyki. Anatomia naczyniowa królika, ułatwia stosowanie standardowych technik i urządzeń neuroradiologii interwencyjnej, wobec czego podjęto się ksenotransplantacji komórek ludzkiego glejaka wielopostaciowego (GBM-1) u dorosłych królików nowozelandzkich. Za pomocą wieloskładnikowej immunosupresji (mykofenolan mofetylu, deksametazon, takrolimus) wywołano tolerancję immunologiczną i stereotaktycznie wszczepiono komórki guza GBM-1 do mózgow królików. Króliki obserwowano przez 42 dni, monitorowano za pomocą RM i pomiarów masy ciała oraz poddano pośmiertnej analizie histopatologicznej. Na podstawie sekwencji T2 w RM u badanych zwierząt zidentyfikowano guzy mózgu. Ponadto, analiza histologiczna przy użyciu barwienia HE potwierdziła umiejscowienie guzów zgodnie ze skanami RM, a ich ludzkie pochodzenie potwierdzono za pomocą barwień immunohistochemicznych przeciwko antygenom specyficznym dla człowieka. Przedstawiona metoda modelowania ludzkiego glejaka u królików może stanowić podstawę do testowania nowatorskich strategii leczenia, w tym dotętniczego podawania leków.

b. Analiza znaczenia gleju w etiologii i przebiegu mielopatii degeneracyjnej jako modelu SLA u człowieka

Jak wykazano w wielu badaniach ostatnich lat, oligodendrocyty są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania neuronów, poprzez produkcję mieliny oraz dostarczanie aksonom metabolitów i energii za pośrednictwem transporterów monokarboksylianów (MCT). Na podstawie tkanek rdzenia kręgowego psów chorych na MD, przekazanych przez dr Coates, będących na różnych etapach choroby, przeprowadzono analizę histologiczną i molekularną pod kątem wybranych genów i białek, związanych z funkcjonowaniem neuronów, oligodendrocytów, mieliny i MCT. U psów chorych na MD analiza histopatologiczna charakteryzowała się utratą barwienia eriochromowego, wskazującego na demielinizację, co potwierdzono analizą molekularną i zmniejszoną ekspresją genów związanych z mielina, w tym *MBP*, *Olig1* i *Olig2*. Ponadto, znacząca redukcja ekspresji mRNA *MCT1* i *MCT2* oraz podwyższona ekspresja *MCT4* wskazywała na zakłócony dopływ energii do neuronów. Uzyskane dane potwierdziły znaczenie komórek glejowych w przebiegu MD, co jest zgodne z przebiegiem SLA u ludzi, wobec czego

model MD może być idealną platformą do badań przedklinicznych nad terapiami w SLA, co zostało przez nas wykorzystane m.in. w pracach wchodzących w skład osiągnięcia naukowego.

W ramach powyższych badań opublikowano prace:

- H. Qin, M. Janowski, M. Pearl, **I. Małysz-Cymborska**, S. Li, C. Eberhart, P. Walczak. Rabbit Model of Human Gliomas: Implications for Intra-Arterial Drug Delivery. PLoS One. 2017 Jan 19;12(1):e0169656. (MNiSW₂₀₁₇, 40 pkt; IF₂₀₁₇ 2,766)
- D. Gołubezyk, **I. Małysz-Cymborska**, I. Kalkowski, M. Janowski, J. Coates, J. Wojtkiewicz, W. Maksymowicz, P. Walczak. The Role of Glia in Canine Degenerative Myelopathy: Relevance to Human Amyotrophic Lateral Sclerosis. Mol Neurobiol. 2019 Aug;56(8):5740-5748. (MNiSW₂₀₁₉, 100 pkt; IF₂₀₁₉ 4,500)

5.2.3. Możliwości terapeutyczne wykorzystania komórek macierzystych oraz biomateriałów w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych

a. Charakterystyka i właściwości immunologiczne progenitorowych komórek glejowych jako potencjalnych terapeutów w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych

Jednym z przedmiotów moich badań realizowanych w Katedrze Neurochirurgii Wydziału Lekarskiego UWM było zastosowanie komórek macierzystych w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych, a przez to wieloletnia praca nad komórkami MSC czy GRP pochodzących od różnych gatunków zwierząt. W ramach współpracy z grupą Prof. Kurpisza z Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu podjęto badania nad poznaniem profilu immunologicznego oraz potencjału terapeutycznego progenitorów glejowych pochodzenia mysiego, psiego oraz linii ludzkich progenitorów glejowych QSV40. Wykazano, że komórki GRP wszystkich badanych gatunków utrzymują stabilny fenotyp nieodróżnionych komórek w długoterminowych hodowlach *in vitro*. Psie GRP oraz ludzkie komórki QSV40 były immunologicznie obojętne, o czym świadczy brak ekspresji MHC-II i cząsteczek kostymulujących. Obecność CD40 na mysich GRP potwierdziła istotne różnice w biologii GRP między gatunkami. Wszystkie rodzaje GRP miały jednak zdolność do różnicowania w kierunku astrocytów. Kompleksowa charakterystyka fenotypowa i immunologiczna różnych gatunków GRP oraz potwierdzenie ich zdolności do różnicowania w astrocyty stanowi podstawę do przewidywania odpowiedzi GRP na mikrośrodowisko uszkodzonego OUN po ich transplantacji w różnych modelach terapeutycznych.

b. Zastosowanie hydrożeli na bazie gumy gelanowej i hialuronianu do terapii w chorobach neurodegeneracyjnych

Kolejnym aspektem moich badań w Katedrze Neurochirurgii, w ramach projektu Nanotech4ALS była optymalizacja biomateriałów, mających na celu zabezpieczenie transplantowanych komórek macierzystych przed odrzuceniem ze strony układu immunologicznego biorcy oraz wspomaganie funkcji komórek po przeszczepie. Projekt Nanotech4ALS jest projektem o zasięgu międzynarodowym, w którym partnerami są strony polska, portugalska oraz norweska. Dzięki bardzo dobrej współpracy z zespołem norweskim – reprezentantami firmy FMC Biopolymer, obecnie DuPont, odbyłam w 2018 roku kilkudniowe

szkolenie z zakresu przygotowania biomateriałów na bazie alginianu sodu, ich optymalizacji i zasad pracy w laboratorium o standardzie GLP. Ponadto, od 2016 roku, od początku pracy przy projekcie Nanotech4ALS nawiązałam współpracę z zespołem portugalskim, reprezentowanym przez dr Miquela Oliveirę z Uniwersytetu w Minho, w Portugalii. Grupa ta jest jedną z najbardziej rozpoznawalnych na świecie pod kątem produkcji i optymalizacji biomateriałów. W ramach współpracy z oboma zespołami rozpoczęto współtworzenie innowacyjnego biomateriału, z suplementacją manganem jako środkiem kontrastowym. Opracowana technologia jest obecnie na etapie zgłoszenia patentowego nr. EP17209876.6. Mieszanki hydrożeli na bazie metakrylowanej gumy gellanowej (GG-MA) oraz kwasu hialuronowego (HA) uzupełniono paramagnetycznym Mn^{2+} , aby umożliwić monitorowanie dystrybucji hydrożelu w czasie rzeczywistym za pomocą obrazowania RM w sekwencji T1. Opracowane hydrożele były łatwo wstrzykiwalne i tworzyły stabilne sieci po wstrzyknięciu do płynu mózgowo-rdzeniowego. Hydrożele przygotowane w stosunku 75:25 GG-MA do HA uzupełnione $MnCl_2$ przy 0.1mM wykazały kontrolowaną degradację, odpowiednią przepuszczalność i wyraźny sygnał w RM zarówno in vitro jak i in vivo. Ponadto, ludzkie MSC hodowane w postaci trójwymiarowej w hydrożelach 75:25 GG-MA/HA zachowały żywotność do 14 dni hodowli in vitro. Uzyskane dane potwierdzają, że opracowane hydrożele mogą być doskonałym narzędziem do zabezpieczania i dostarczania komórek macierzystych w celach terapeutycznych.

W ramach powyższych badań opublikowano prace:

- A. Klimczak, U. Kozłowska, J. Sanford, P. Walczak, **I. Małysz-Cymborska**, M. Kurpisz. Immunological Characteristics and Properties of Giall Restricted Progenitors of Mice, Canine Primary Culture Suspensions, and Human QSV40 Immortalized Cell Lines for Prospective Therapies of Neurodegenerative Disorders. *Cell Transplant*. 2019 Sep-Oct;28(9-10):1140-1154. (MNiSW₂₀₁₉, 70 pkt; IF₂₀₁₉ 3,341)
- S. Vieira, P. Strymecka, I. Stanaszek, J. Silva-Correia, K. Drela, M. Fiedorowicz, **I. Małysz-Cymborska**, P. Rogujski, M. Janowski, B. Lukomska, P. Walczak, M. Oliveira. Gellan gum and hyaluronic acid hydrogel blends for image-guided neurointerventions. *J Mater Chem B*. 2020 Jul 15;8(27):5928-5937. (MNiSW₂₀₂₀, 140 pkt; IF₂₀₂₀ 5,344)

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

6.1. Osiągnięcia dydaktyczne

- 2021 – obecnie - Promotor pomocniczy pracy doktorskiej Pani mgr Dominiki Gołubczyk na Wydziale Lekarskim UWM w Olsztynie
- 2017-2019 - Promotor pracy magisterskiej Pana Adama Burczyka, studenta Wydziału Biologii UWM w Olsztynie.

6.2. Organizacja konferencji naukowych

- 2017 – organizacja konferencji 2nd International Conference on Regenerative Medicine,

„Stem cell-based therapies for neurological disorders: advancements and challenges”, Olsztyn, Polska, **członek komitetu organizacyjnego**

- 2016 – organizacja konferencji - International Conference on Regenerative Medicine, „Stop ALS: Therapeutic Targets, Animal Models, Stem cells and clinical applications”, **członek komitetu organizacyjnego**
- 2015 - Nagroda Dyrektora Generalnego Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN za wybitny wkład w popularyzację nauki. Olsztyn, Polska.

6.3. Popularyzacja nauki podczas wystąpień na konferencjach (poniżej wymieniono najważniejsze prezentacje, cały dorobek w tej kwestii zawarty jest w Załączniku 3a):

- 1) **I. Malysz-Cymborska**, D. Golubczyk, L. Kalkowski, M. Janowski, J. Sanford, M. Zawadzki, W. Maksymowicz, P. Walczak. “MRI-guided intra-arterial and intrathecal delivery for global targeting of glial progenitors in canine ALS-like degenerative myelopathy”. BRAIN&BRAIN PET, 4-7.07.2019, Jokohama, Japonia
- 2) **I. Malysz-Cymborska**, L. Kalkowski, D. Golubczyk, U. Kozłowska, M. Janowski, M. Kurpisz, W. Maksymowicz, P. Walczak. „Non-invasive bioluminescence imaging for optimization of hyaluronic acid-based hydrogel to support the survival of embedded glial-restricted progenitors”. 13th European Molecular Imaging Meeting – EMIM, 20-23.03.2018, San Sebastian, Hiszpania
- 3) **I. Malysz-Cymborska**, D. Golubczyk, L. Kalkowski, L. Vieira, M. Janowski, J. Głodek, P. Holak, K. Milewska, W. Maksymowicz, T. Svendsen, R. Reis, J.M. Oliveira, P. Walczak. “Dynamic imaging of manganese labeled hydrogel for interventional MRI-guided intrathecal delivery of stem cells”. 13th European Molecular Imaging Meeting – EMIM, 20-23.03.2018, San Sebastian, Hiszpania
- 4) **I. Malysz-Cymborska**, D. Golubczyk, L. Kalkowski, M. Janowski, J. Sanford, K. Olbrych, P. Holak, W. Maksymowicz, P. Walczak. „Real-time MRI of intrathecal transplantation of hydrogel-embedded glial progenitors in dogs suffering from ALS-like disease”. TERMIS, 3-6.12.2017, Charlotte, USA
- 5) **I. Malysz-Cymborska** “Optimization of alginate hydrogels for intrathecal stem cells delivery”. International Scientific Workshop of EraNet 4 ALS, 6-8.03.2017, Oslo, Norwegia
- 6) **I. Malysz-Cymborska**, D. Golubczyk, L. Kalkowski, M. Janowski, J. Sanford, K. Olbrych, P. Holak, W. Maksymowicz, P. Walczak. “In vivo real-time MRI tracking of hydrogel-embedded glial progenitors transplanted intrathecally in dogs suffering from ALS-like disease degenerative myelopathy”. 12th European Molecular Imaging Meeting – EMIM, 5-7.04.2017, Kolonia, Niemcy

- 7) **I. Malysz-Cymborska**, D. Golubczyk, L. Kalkowski, M. Janowski, J. Sanford, K. Olbrych, P. Holak, W. Maksymowicz, P. Walczak. "Injectable Hydrogels -Promising Biomaterials for Intrathecal Stem Cells Delivery". 2nd International Conference on Regenerative Medicine in Neurology (ICRMN), 29-30.06.2017, Olsztyn, Polska
- 8) **I. Malysz-Cymborska**, A. Burczyk, A. Andronowska. "Molecular consequences of hCG and FSH treatment in cultured porcine oviductal epithelial cells (POEC)". International Conference in Pig Reproduction, 10-14.06.2017, University of Missouri, Columbia, Missouri, USA
- 9) **I. Malysz-Cymborska**, D. Golubczyk, L. Kalkowski, M. Janowski, J. Wojtkiewicz, W. Maksymowicz, P. Walczak. „Improving efficacy of intrathecal targeting of cells by the use of injectable hydrogels”. International Conference on Regenerative Medicine in Neurology (ICMRM), 22-23.06.2016. Olsztyn, Polska
- 10) **I. Malysz-Cymborska**, D. Golubczyk, L. Kalkowski, M. Janowski, J. Wojtkiewicz, W. Maksymowicz, P. Walczak. „Optimization of injectable hydrogels to support survival and facilitate migration of embedded progenitor cells”. TERMSTEM, 27-28.10.2016, Guimaraes, Portugal
- 11) **I. Malysz-Cymborska**, L. Kalkowski, D. Golubczyk, M. Janowski, J. Wojtkiewicz, P. Walczak. „Migration and survival of glial restricted precursors grown as single cells or neurospheres embedded in hyaluronic acid- based hydrogels with the prospect of using them as intrathecally injectable composites”. ISN&N, 19-22.04.2016, Lipsk, Niemcy
- 12) **I. Malysz-Cymborska**, A. Andronowska. „Does the methods of assisted reproduction influence oviductal environment”? 25-26.10.2014 Jabłonna, Polska
- 13) **I. Malysz-Cymborska**, A. Andronowska. „Wpływ indukcji cyklu rujowego oraz superowulacji na syntezę prostacykliny w jajowodzie świni”. VI Congress of Society for Biology of Reproduction 10-12.09.2014, Torun, Polska
- 14) **I. Malysz-Cymborska**, A. Andronowska. "Long-lasting changes of E2 and P4 in the blond serum and ESR1, ESR2, PGR, LHCGR and FSHR In the porcine oviduct after ovarian stimulation with hCG and eCG". Epigenetics and Periconception Environment, 07-09.05.2014, Las Palmas, Hiszpania
- 15) **I. Malysz-Cymborska**, A. Andronowska. „Changes of expression of the VEGF/VEGFR In the porcine oviducts after ovarian stimulation with hCG and eCG“. I Conference of Young Scientists . Biotechnology in animal production, 24-25.04.2014 Warszawa, Polska
- 16) **I. Malysz-Cymborska**, A.J. Ziecik, A. Waclawik, A. Andronowska. "Insemination affects prostaglandins and VEGF system expression in the porcine oviduct". XLVII Symposium of The Polish Society for Histochemistry and Cytochemistry, 04-06.09.2013, Olsztyn, Polska, wyróżnienie wystąpienia

- 17) **I. Malysz-Cymborska**, A.J. Ziecik, A. Andronowska. „The effect of exogenous gonadotropin treatment on VEGF and its receptors gene expression in the porcine oviduct”. 9th International Conference on Pig Reproduction, 9-12.06.2013, Olsztyn, Polska
- 18) **I. Malysz-Cymborska**, A.J. Ziecik, A. Andronowska. “Does the hormonal manipulation of estrus can change the VEGF signaling pathway in porcine oviduct”? GEMINI's 4th Annual Meeting, Maternal Interaction with Gametes and Embryos, 29.09-02.10.2011 Gijon, Hiszpania
- 19) **I. Malysz-Cymborska**, A.J. Ziecik, A. Andronowska. "Effect of superovulation on the expression of prostaglandin synthesis pathway enzymes in the porcine oviduct". VI Congress of Society for Biology of Reproduction, 7-9.09.2011, Polańczyk, Polska
- 20) **I. Malysz-Cymborska**, A. Andronowska. "Influence of the exogenous gonadotropins (eCG, hCG) on the expression of prostaglandin synthesis pathway enzymes in the porcine oviduct". Biomedical and basic studies in the center of excellence BIOANIREP, 12-14.06.2011 Wiczba, Polska
- 21) **I. Malysz-Cymborska**, A. Andronowska "Effect of superovulation on the expression of prostaglandin synthesis pathway enzymes in the porcine oviduct". Utilization of molecular biology tools to quality improvement of products descended from animals, health and animal reproduction, Animbiogen in EU 10-11.03.2011 Jastrzębiec, Polska
- 22) **I. Malysz-Cymborska**, B. Wasilewska, M. Rowiak, K. Bogus-Nowakowska. "Somatostatin-like immunoreactivity in the neostriatum of the guinea pig". 29th Congress of Polish Anatomical Society, 03-05.09.2009, Bydgoszcz, Polska
- 23) **I. Malysz-Cymborska**, i in. "Differences in the immunoreactivity of neurons containing the cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) and neuropeptide Y (NPY) in the mammillary body nuclei of the newborn and adult guinea pig". XLIII Symposium of The Polish Society for Histochemistry and Cytochemistry 04-06.09.2009, Bydgoszcz, Polska

7. Udział w projektach badawczych

7.1. Projekty finansowane przez instytucje krajowe i zagraniczne

- 07.2019 - obecnie **Asystent (główny wykonawca)** w projekcie „Endowaskularny model udaru u świń jako platforma do rozwoju terapii immunomodulujących”, OPUS, NCN, Katedra Neurochirurgii, UWM, Olsztyn, Polska
- 01.2018 - 31.12.2018 **Adiunkt (wykonawca)** w projekcie Explore Me "Wykorzystanie potencjału regeneracyjnego mezenchymalnych komórek macierzystych", Startegmed, NCBR, Katedra Neurochirurgii, UWM, Olsztyn, Polska

- 07.2016 - 31.06.2019 **Adiunkt (główny wykonawca)** w projekcie NanoTech 4 ALS „Monitorowana w MRI transplantacja ludzkich progenitorów glejowych umieszczonych na nośnikach hydrożelowych do kanału kręgowego zwierząt w leczeniu stwardnienia zanikowego bocznego”, NanoTech4ALS, NCBR, Katedra Neurologii i Neurochirurgii, UWM, Olsztyn, Polska
- 08.2015 - 12.2017 **Adiunkt (główny wykonawca)** w projekcie GRP & ALS „Zastosowanie progenitorów glejowych w leczeniu ALS”, Strategmed, NCBR, Katedra Neurologii i Neurochirurgii, UWM, Olsztyn, Polska
- 02.2013 - 02.2016 **Kierownik projektu** „Wpływ egzogennych gonadotropin na syntezę prostaglandyn w jajowodzie świni”, Preludium 3, NCN, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności, PAN, Olsztyn
- 03.2013 - 05.2015 **Wykonawca (doktorant)** w projekcie "Udział chemokin w regulacji funkcji ciałałka żółtego", OPUS, NCN, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności, PAN, Olsztyn, Polska
- 10.2010 - 06.2012 **Wykonawca (doktorant)** w projekcie "Wpływ superowulacji na ekspresję szlaku sygnałowego VEGF w jajowodzie", Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności, PAN, Olsztyn

7.2. Projekty prowadzone w ramach działalności statutowej

- 2020-2021 **kierownik projektu statutowego** „Opracowanie nowego modelu glejaka wielopostaciowego u szczura i świni z zachowaniem pełnej funkcjonalności układu odpornościowego”
- 2017-2019 **główny wykonawca** w projekcie "Charakteryzacja mielopatii degeneracyjnej u psów jako modelu ALS"
- 2017-2019 **główny wykonawca** w projekcie "Opracowanie właściwości fizykochemicznych i biokompatybilności hydrożeli przydatnych do intratekalnych przeszczepów komórkowych GRP"

7.3. Udział w redakcji czasopism naukowych oraz recenzowaniu publikacji

Od początku bieżącego roku pełnię funkcję redaktora tematu w międzynarodowym czasopiśmie Applied Sciences Journal (IF 2.474). Ponadto, od 2016 roku miałam przyjemność recenzować publikacje w dziewięciu czasopismach o zasięgu międzynarodowym:

1. Biomedicines (IF 4.757): od 2021 – obecnie, 2 recenzje
2. Science Advances Journal (IF 13.117): od 2017 – obecnie, 1 recenzja
3. Prostaglandins and other Lipid mediators Journal (IF 2.283): od 2016 – obecnie, 1 recenzja
4. Nanoscale Journal (IF 6.895): od 2019 – obecnie, 1 recenzja
5. International Journal of Molecular Sciences (IF 4.556): od 2020 – obecnie, 1 recenzja
6. Children Journal (IF 2.078): od 2020 – obecnie, 1 recenzja
7. Journal of Clinical Medicine (IF 3.303): od 2020 – obecnie, 1 recenzja
8. International Journal of Environmental Research and Public Health (IF 2.879): od 2021 – obecnie, 1 recenzja
9. Life Journal (IF 2.991): od 2021 – obecnie, 1 recenzja

7.4. Staże w zagranicznych i krajowych ośrodkach naukowych lub akademickich

Staże zagraniczne

- 29.01 - 03.02.2018 Szkolenie z przygotowania biomateriałów i zasad pracy w laboratorium standardu GLP, Novamatrix / DuPont, Sandvika, Norwegia
- 04.2016 - 05.2016 Staż z zakresu biologii komórkowej, Zakład Radiologii, Instytut Inżynierii Komórkowej, Johns Hopkins University, USA
- 09.2012 - 10.2012 Staż w Transmission Electron Microscopy, Veterinär-Anatomisches Institut, Universität Zürich, Zürich, Szwajcaria

Staże krajowe

- 04.2010 - 10.2010 Staż z biologii molekularnej, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN, Olsztyn, Polska

7.5. Zgłoszenia patentowe

1. Hydrogel comprising manganese, methods and uses thereof. Nr EP17209876.6
2. „Sposób izolacji oraz hodowli pierwotnej in vitro niesortowanych psich progenitorów glijowych”; Złożony 13 paź 2020; Nr P.435666

Izabela Małysz-Cymborska
(podpis wnioskodawcy)