

Załącznik nr 2

do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego

AUTOREFERAT

dr Joanna Sypecka

adiunkt w Zakładzie Neurobiologii Naprawczej
Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. M. Mossakowskiego PAN w Warszawie

1. Imię i nazwisko:

Joanna Sypecka

Zakład Neurobiologii Naprawczej
Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. M. Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk
ul. A. Pawińskiego 5, 02-106 Warszawa
e-mail: jsypecka@imdik.pan.pl

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

- 1990- magister biologii, specjalność mikrobiologia, Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego, promotor Prof. dr hab. Zbigniew Kwiatkowski
- 1996- doktor nauk przyrodniczych, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN.
Praca doktorska zatytułowana „Plejotropowe oddziaływanie mutacji genu PLP u królika *Pf*” - promotor: Prof. dr hab. Krystyna Domańska-Janik. Praca nagrodzona wyróżnieniem Rady Naukowej IMDiK PAN oraz wyróżnieniem w konkursie im. Aurelii Baczko na najlepszą pracę doktorską w dziedzinie nauk medycznych w 1996 roku.

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

- 1991-1996 Studia doktoranckie w Zakładzie Neurochemii IMDiK PAN
1997-2005 Asystent w Zakładzie Neurobiologii Naprawczej IMDiK PAN
od 2006 Adiunkt w Zakładzie Neurobiologii Naprawczej IMDiK PAN

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

Tytuł osiągnięcia:

Charakterystyka progenitorów oligodendrocytarnych oraz ocena wpływu lokalnego mikrośrodowiska na rozwój i funkcje oligodendrocytów

4.1. Spis publikacji wchodzących w skład osiągnięcia

1. **Sypecka J.** (2003) Different vulnerability to cytotoxicity and susceptibility to protection of progenitors versus mature oligodendrocytes. *Pol. J. Pharmacol.*, 55: 881-885 (obecnie *Pharmacological reports*)
IF=0.829; 5-letni IF=2.223; MNiSW=8
2. **Sypecka J**, Sarnowska A, Domanska-Janik K (2009) Crucial role of the local micro-environment in fate decision of neonatal rat NG2 progenitors. *Cell Prolif.* 42(5): 661-671.
IF=2.917, 5-letni IF= 2.818; MNiSW=32
3. Buzanska L, **Sypecka J**, Nerini-Molteni S, Compagnoni A, Hogberg HT, del Torchio R, Domanska-Janik K, Zimmer J, Coecke S. (2009). A human stem cell-based model for identifying adverse effects of organic and inorganic chemicals on the developing nervous system. *Stem Cells*: 27(10): 2591-601.
IF=7.747, 5-letni IF= 8.368; MNiSW=32
4. **Sypecka J**, Dragun-Szymczak P, Zalewska T, Domańska-Janik K. (2009) Laminin promotes oligogliogenesis and increases MMPs activity in human neural stem cells of HUCB-NSC line. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*: 69(1): 37-45.
IF=1.337, 5-letni IF=1.804; MNiSW=13
5. Wójcik-Stanaszek L, **Sypecka J**, Szymczak P, Ziemka-Nalecz M, Khrestchatsky M, Rivera S, Zalewska T. (2011) The potential role of metalloproteinases in neurogenesis in the gerbil hippocampus following global forebrain ischemia. *PLoS One*: 6(7): e22465.
IF=4.092, 5-letni IF= 4.244; MNiSW=40
6. **Sypecka J**, Sarnowska A, Gadomska-Szablowska I, Lukomska B, Domanska-Janik K (2013) Differentiation of glia-committed NG2 cells: the role of factors released from hippocampus and spinal cord *Acta Neurobiol Exp (Wars)*: 73(1): 117-130
IF=1.977, 5-letni IF=1.804; MNiSW=15
7. **Sypecka J**, Sarnowska A. (2013): Heterogeneity of local tissue microenvironment influences differentiation of oligodendroglial progenitors. *Folia Neuropathol*: 51(2): 103-110.
IF=1.547, 5-letni IF=1.204; MNiSW=20
8. **Sypecka J**, Sarnowska A (2013): The neuroprotective effect exerted by oligodendroglial progenitors on ischemically impaired hippocampal cells. *Molecular Neurobiology* 48 (2): DOI 10.1007/s12035-013-8549-9
IF=5.471, 5-letni IF= 5.535; MNiSW=35

* Opis indywidualnego wkładu habilitantki w powstanie każdej z wyżej wymienionych publikacji znajduje się w Załączniku 4. Oświadczenia wszystkich współautorów dotyczące ich udziału w powstaniu poszczególnych prac zebrane zostały w Załączniku 8.

4.2 Omówienie celu naukowego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Charakterystyka progenitorów oligodendrocytarnych oraz ocena wpływu lokalnego mikrośrodowiska na rozwój i funkcje oligodendrocytów

WPROWADZENIE

Oligodendrocyty, odpowiedzialne za mielinogenezę i utrzymanie funkcjonalnej mieliny w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN), powstają w procesie wieloetapowego różnicowania się komórek progenitorowych, tzw. OPCs (z angielskiego *oligodendrocyte progenitor cells*, OPCs). Progenitory oligodendrocytarne powstają w procesie gliogenezy już we wczesnych etapach życia płodowego i cechują się m.in. obecnością na swej powierzchni proteoglikanu siarczanu chondroityny, określanego skrótem NG2 (ang. *nerve/glial antigen 2*) [1]. Zaburzenia procesu gliogenezy, złożonego mechanizmu różnicowania OPCs, biosyntezy składników mieliny, a także nieprawidłowości w formowaniu otoczki mielinowej i jej metabolizmie stanowią przyczynę wielu wrodzonych i nabytych chorób. Wśród najczęściej spotykanych chorób związanych z dysfunkcją oligodendrocytów/mieliny możemy wyróżnić między innymi leukodystrofię wrodzoną o podłożu genetycznym, związane z hypomielinizacją OUN wynikającą z zaburzenia dojrzewania oligodendrocytów, nieprawidłowej syntezy składników mieliny lub jej wadliwym metabolizmem prowadzącym do wtórnych demielinizacji. Do klasycznych leukodystrofii zalicza się m.in. chorobę Pelizacusa-Merzbachera (mutacje w genie PLP kodującym jeden z głównych komponentów otoczki mielinowej), leukodystrofię globoidalną (choroba Krabbe'go spowodowana letalnym defektem w genie GalC, kodującym beta-galaktozydazę galaktocerebrozydu), leukodystrofię metachromatyczną (o charakterze lizosomalnego schorzenia spichrzeniowego wywołanego przez mutację w genie kodującym arylosulfatazę A, prowadzącą do akumulacji toksycznego sulfogalaktozylceramidu i w efekcie letalnej, progresywnej demielinizacji), leukodystrofię fibrynoidalną (choroba Alexandra, defekt w genie kodującym GFAP), adrenoleukodystrofię (wywołaną gromadzeniem się kwasów tłuszczowych o bardzo długich łańcuchach), leukodystrofię gąbczastą (choroba Canavan, związana z niedoborem N-acetyloaspartazy) oraz wiele innych dziedzicznych zaburzeń, często o niepoznanej dotąd etiologii [2]. Inną, obszerną grupę schorzeń stanowią leukoencefalopatie, w których dochodzi do wtórnych demielinizacji na skutek genetycznych chorób metabolicznych (np. zespół Wilsona wywołany

spichrzaniem miedzi czy miopatia mitochondrialna-MELAS) [3]. Do najczęściej występujących demielinizacji OUN zaliczyć można także choroby wywołane infekcjami wirusowymi (polyoma JC), reakcją autoimmunologiczną (stwardnienie rozsiane), chorobami naczyń mózgowych, a także epizodami ischemicznymi i hypoksyjnymi, zatruciami (głównie metalami ciężkimi) oraz powikłaniami postradiologicznymi [4, 5]. Szacuje się, że w ostatnich latach następuje również coraz większy wzrost demielinizacji związanych z mechanicznym uszkodzeniem rdzenia kręgowego (ponad 11 tys. nowych przypadków rocznie w USA, w tym około 38 % spowodowanych wypadkami komunikacyjnymi i przemysłowymi, 28 % powstałych w skutek przemocy, zaś 6 % związanych z uprawianiem dyscyplin sportowych) [6].

Dys/demielinizacja o różnym stopniu zaawansowania wiąże się najczęściej z występowaniem różnorodnych zaburzeń neurologicznych, takich jak drżenia, niedowłady, ataksja, otępienie, opóźnienie rozwoju somatycznego i wiele innych podobnych symptomów o zróżnicowanym nasileniu. Pierwotne i wtórne przyczyny powodujące wystąpienie choroby, a następnie decydujące o jej przebiegu oraz dokładne mechanizmy zmian patologicznych są w wielu przypadkach wciąż nieznane, uniemożliwiając w ten sposób poszukiwanie skutecznych terapii.

Jedną z głównych przyczyn istniejącego stanu rzeczy jest brak dostatecznej wiedzy o przebiegu procesu gliogenezy oraz czynnikach wpływających na prawidłowe funkcjonowanie komórek glejowych. W szczególności niewystarczająco poznana jest do tej pory natura progenitorów oligodendrocytarnych. Z dotychczasowych doniesień wynika, że są to komórki pojawiające się już w pierwszym trymestrze życia płodowego. Obecność mieliny, świadcząca o istnieniu dojrzałych, funkcjonalnych oligodendrocytów, obserwowana jest w przypadku wybranych motoneuronów już na przełomie 4 i 5 miesiąca gestacji [7]. Pierwszymi komórkami odpowiedzialnymi za tworzenie przyszłej tkanki nerwowej są samoodnawiające się neuralne komórki macierzyste powstające z neuroepitelium, wyścielającego zamykającą się cewkę nerwową i wykształcające się komory mózgu. Wraz z początkiem neurogenezy, neuroepitelium przekształca się w komórki gwiaździste (ang. *radial glial cell*), będące tzw. progenitorami pierwotnymi. Podczas procesu gliogenezy dają one początek komórkom ependymalnym, prekursorom astro- oraz oligodendrocytarnym, a także intensywnie namnażającym się tzw. progenitorom pośrednim (ang. *intermediate progenitor cells*) [8]. O przejściu od procesu neurogenezy do gliogenezy decyduje ekspresja specyficznych czynników aktywnych, wypadkowa gradientu ich stężeń, a także okres ich oddziaływania. Do

czynników neurogennych zaliczamy przede wszystkim wydzielane w grzbietowej części cewki nerwowej białka z rodziny BMP (czynnik morfogenetyczny kości, ang. *bone morphogenetic protein*-głównie BMP 4 oraz BMP 5), Wnt (ang. *Wingless-Type MMTV Integration Site Family*), FGF (czynnik wzrostu fibroblastów, ang. *fibroblast growth factor*) oraz białka typu hox (homeoboksove) [9-11]. Natomiast za główny czynnik gliogeny uważane jest białko SHH (ang. *sonic hedgehog*), wydzielane przez płytkę podstawną i biorące udział w tworzeniu przeciwnego (w osi grzbietowo-brzuszej) gradientu stężeń czynników glio- oraz neurogennych [12]. Gliogeneza zapoczątkowana jest poprzez autoproteolizę oraz modyfikacje lipidowe białka SHH, które uruchamiają ścieżkę sygnałową prowadzącą do segmentacji cewki nerwowej i ekspresji określonych czynników transkrypcyjnych [13]. W ten sposób wyodrębnione zostają domeny charakteryzujące się obecnością czynników odpowiedzialnych za ekspresję wybranych genów: domena p0 (w której przeważa reelinina), domena p1 (gdzie wydzielana jest przede wszystkim reelinina oraz PAX6), domena p2 (cechująca się obecnością PAX6, Nkx.6.1, SLIT1) oraz domena p3 (charakteryzująca się ekspresją czynników Nkx.6.1 oraz SLIT1), w których zachodzi intensywna astrogliogeneza. Natomiast domena pMN, w której wydzielane są wybiórczo czynniki Olig-2 oraz Nkx.2.2, staje się miejscem powstawania OPCs, zasiedlających wykształcający się OUN. Wędrujące progenitory oligodendrocytarne odpowiadają na lokalne, dotąd mało poznane bodźce mikrośrodowiskowe, które decydują o kierunku migracji, przeżyciu i proliferacji komórek [13]. Pod wpływem sygnałów zewnątrzkomórkowych, pochodzących prawdopodobnie głównie z sąsiednich włókien nerwowych, część OPCs ulega wieloetapowemu procesowi różnicowania w funkcjonalne oligodendrocyty. Duża liczba progenitorów oligodendrocytarnych pozostaje jednak w postaci niezróżnicowanych, skąpowypustkowych komórek, obecnych zarówno w rozwijającym się, jak i dojrzałym OUN. Wykazano, że w dojrzałym mózgu stanowią one odpowiednio około 8-9% wszystkich komórek istoty białej oraz w przybliżeniu 2-3 % istoty szarej [14, 15]. Z badań ostatnich lat wynika, że po okresie intensywnej mielinizacji, oligodendrocyty mogą powstawać zarówno z OPCs rozproszonych w parenchymie mózgu, jak i z neuralnych komórek macierzystych rezydujących w wyodrębnionych niszach: w strefie okołokomorowej (ang. *subventricular zone*, SVZ) położonej podwyściółkowo w pobliżu komór bocznych mózgowia oraz w nieneurogenym rejonie strefy podziarnistej (ang. *subgranular zone*, SGZ) w obszarze zakrętu zębatego (ang. *dentate gyrus*, DG) hipokampa [16, 17]. Dane literaturowe wskazują, że progenitory oligodendrocytarne posiadają zdolność do proliferacji oraz migracji nawet w dorosłym OUN. Zjawisko to zachodzi najczęściej w odpowiedzi na nagłe uszkodzenia

(głównie rdzenia kręgowego), a także w przewlekłych stanach chorobowych, którym towarzyszy hypo/demielinizacja [18, 19].

OMÓWIENIE PRAC STANOWIĄCYCH PODSTAWĘ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

Wymienione cechy progenitorów oligodendrocytarnych, ich duża liczba, a przede wszystkim potencjalna możliwość zastosowań klinicznych OPCs sprawiły, że komórki te stały się przedmiotem wielokierunkowych badań. W moim przypadku wszystkie prowadzone projekty naukowe po uzyskaniu stopnia doktora związane były z badaniem neuralnych komórek macierzystych i procesu gliogenezy oraz charakterystyką właściwości progenitorów glejowych, a w szczególności określeniem ich przydatności w opracowaniu terapii komórkowych [punkt 5.1.2-(13)]. Badania prowadzone były w Zakładzie Neurobiologii Naprawczej, kierowanym początkowo przez panią profesor Krystynę Domańską-Janik, a obecnie przez panią profesor Barbarę Łukomską. W celu dokładniejszego opisu osiągnięć w tej dziedzinie, wybrałam najważniejsze opublikowane dotychczas prace, które dotyczą charakterystyki progenitorów oligodendrocytarnych i określenia wpływu lokalnego mikrośrodowiska na rozwój i funkcje oligodendrocytów.

Za jedną z głównych przyczyn nabytych leukodystrofii uważa się zaburzenia homeostazy tkankowej spowodowane niedotlenieniem okołoporodowym. Z uwagi na to, że proces gliogenezy najintensywniej zachodzi właśnie w okresie perinatalnym, wydaje się że podłożem procesów neurodegeneracyjnych będących następstwem czasowego niedokrwienia/niedotlenienia może być ubytek progenitorów komórek odpowiedzialnych za mielinizację włókien nerwowych następującą w tym okresie rozwojowym. Zaburzenia procesu mielinizacji, które wynikają prawdopodobnie z niedostatecznej liczby komórek progenitorowych lub z ich nieprawidłowego różnicowania, stanowią przyczynę szeregu objawów neurologicznych notowanych po wystąpieniu okresowego niedoboru tlenu [20]. Odnosząc się do postawionej hipotezy, w badaniach *in vitro* porównałam komórki o charakterze progenitorowym oraz dojrzałe oligodendrocyty, zdolne do ekspresji składników błony mielinowej, pod względem ich wrażliwości odpowiednio na stres oksydacyjny i niedobór czynników odżywczych. Opis prowadzonych badań zamieszczony został w pracy: **Different vulnerability to cytotoxicity and susceptibility to protection of progenitors versus mature oligodendrocytes.** Sypecka J. (2003), *Pol. J. Pharmacol.*, 55, 881-885

Wyniki zawarte w powyższej publikacji jednoznacznie wskazują na dużą podatność progenitorów na stres oksydacyjny, który przyczynia się do drastycznego obniżenia wskaźnika przeżywalności komórek. Jak wynika z prowadzonych badań, nawet krótkotrwałe zmiany zawartości tlenu i substancji odżywczych w pożywce hodowlanej przyczyniają się do nasilenia zjawiska apoptozy, jednocześnie powodując zahamowanie proliferacji pozostałych progenitorów i przyspieszenie procesu ich dojrzewania. Badania porównawcze komórek progenitorowych i zróżnicowanych oligodendrocytów wykazały, że dojrzałe oligodendrocyty cechują się znaczną odpornością na okresowe wahania zawartości tlenu w mikrośrodkowisku. Uzyskane wyniki przyczyniają się do wyjaśnienia podłoża negatywnych skutków czasowego niedotlenienia w okresie okołoporodowym. Intensywnie zachodząca w okresie perinatalnym gliogeneza budzi jednak duże nadzieje na uruchomienie procesów kompensacyjnych, przynajmniej częściowo ograniczających negatywne skutki zaistniałych uszkodzeń. Ta przesłanka skłoniła mnie do poszukiwania czynników stymulujących proces gliogenezy.

Badania nad czynnikami regulującymi proces gliogenezy prowadzone były z wykorzystaniem ludzkich neuralnych komórek macierzystych pochodzących z krwi pępowinowej. Krew pępowinowa uznawana jest za jedno z najlepszych źródeł komórek przewidzianych do zastosowań terapeutycznych. Jest to źródło etycznie niekontrowersyjne, zaś komórki są łatwe do pozyskania i przechowywania, cechują się niską immunogennością i mogą być stosowane zarówno do przeszczepów autologicznych, jak i allogenicznych. Wśród największych zalet krwi pępowinowej wymienić można jej stosunkowo łatwą dostępność, ponieważ zgromadzona jest w relatywnie dużych ilościach w wielu publicznych bankach krwi (www.savethecordfoundation.org, www.bethematch.org, etc). Zaplanowane eksperymenty na otrzymanej przez profesor Leonorę Bużanską linii HUCB-NSC (*Human Umbilical Cord Blood-derived Neural Stem Cells*) [21] dotyczyły badania *in vitro* wpływu wybranych składników macierzy zewnątrzkomórkowej (takich jak laminina, kolagen, fibronektyna, witronektyna) na ukierunkowanie neuralnych komórek macierzystych w komórki glejowe. Wyniki tych eksperymentów zostały opisane w publikacji zatytułowanej:

Laminin promotes oligogliogenesis and increases MMPs activity in human neural stem cells of HUCB-NSC line. Sypecka J, Dragun-Szymczak P, Zalewska T, Domańska-Janik K. (2009) *Acta Neurobiol Exp* (Wars): 69(1): 37-45.

Przeprowadzone badania wskazują, że czynnikiem najbardziej efektywnie promującym gliogenezę jest laminina. Poszukując wyjaśnienia sposobu oddziaływania czynników zaangażowanych w powstawanie oligodendrocytów, badaliśmy metodą zymografii *in situ*

aktywność metaloproteinaz (ang. *matrix metalloproteinases*, MMPs) z rodziny żelatynaz: MMP-2 (żelatynazy A) oraz MMP-9 (żelatynazy B), uczestniczących w fizjologicznej przebudowie macierzy zewnątrzkomórkowej. Wybór metody badań, opartej na dodawaniu do pożywki hodowlanej znakowanej żelatyny, podyktowany był dążeniem do ewaluacji rzeczywistej aktywności tych enzymów w procesie różnicowania i dojrzewania oligodendrocytów. Uzyskane wyniki wskazują, że w przypadku komórek progenitorowych aktywność MMPs obserwowana jest zarówno w jądrze komórkowym, jak i poza komórką, podczas gdy w dojrzałych oligodendrocytach enzymy te umiejscowione są przede wszystkim w cytoplazmie, a ich aktywność stopniowo maleje. Zaobserwowaliśmy przy tym wyraźną korelację między hodowlą na wybranych substratach macierzy zewnątrzkomórkowej a aktywnością badanych enzymów proteolitycznych. Najwyższa odnotowana aktywność żelatynaz miała miejsce w przypadku zastosowania lamininy, znamiennie niższa była w przypadku fibronektyny i kolagenu, zaś najniższą aktywność obserwowano w przypadku hodowli na powierzchni pokrywanej poly-L-lizyną, która nie jest zaliczana do składników ECM. Wyniki naszych badań wskazują na zaangażowanie MMP-2/MMP-9 w procesy gliogenezy. Obecność aktywnych enzymów w przestrzeni międzykomórkowej sugeruje ich udział w przebudowie macierzy zewnątrzkomórkowej podczas nasilonej migracji prekursorów oligodendrocytarnych, a także w tworzeniu przez nie rozgałęzionych wypustek podczas dojrzewania i poszukiwania aksonów w celu rozpoczęcia procesu mielinizacji. Jednocześnie wykazaliśmy, że zastosowanie lamininy (a także, z mniejszą efektywnością, fibronektyny) w protokołach laboratoryjnych znamiennie zwiększa wydajność procedury otrzymywania *in vitro* dojrzałych oligodendrocytów z ludzkich neuralnych komórek macierzystych.

Badania mające na celu wyjaśnienie mechanizmu udziału metaloproteinaz w procesach zarówno neurogenezy, jak i gliogenezy były kontynuowane w eksperymentach z zastosowaniem różnorodnych inhibitorów badanych enzymów. Wśród wybranych związków znalazły się zarówno inhibitory o szerokim spektrum działania (1,10-O-fenantrolina: GM6001 oraz doksycyklina), inhibitor proteinaz serynowych (Pefabloc SC), selektywny inhibitor furyn (Dec-RVKKR-CMK), a także specyficzny inhibitor kompetycyjny MMP-2 i MMP-9 (SB-3CT). Otrzymane wyniki dotyczące wpływu zahamowania MMP-2/MMP-9 na proliferację i różnicowanie neuralnych komórek macierzystych wykazały znamienny spadek zarówno współczynnika proliferacji komórek, jak i liczby nowopowstałych neuronów. Przeprowadzone badania zostały szczegółowo opisane w kolejnej publikacji zatytułowanej:

The potential role of metalloproteinases in neurogenesis in the gerbil hippocampus following global forebrain ischemia. Wójcik-Stanaszek L, Sypecka J, Szymczak P, Ziemka-Nalecz M, Khrestchatisky M, Rivera S, Zalewska T. (2011) *PLoS One*: 6(7): e22465.

Poczynione w trakcie pracy eksperymentalnej obserwacje dotyczące znamienego zahamowania *in vitro* procesu neurogenyzy na skutek podania inhibitorów metaloproteinaz porównywane były z aktywnością metaloproteinaz *in vivo* w warunkach fizjologicznych oraz w modelu uszkodzenia ischemicznego. Przeprowadzone przez nas badania potwierdziły rzeczywisty udział aktywnych metaloproteinaz w procesie rekrutacji i różnicowania endogennych komórek prekursorowych.

Udowodniona w naszych dotychczasowych pracach badawczych możliwość modulacji *in vitro* procesu gliogenezy, prowadząca do zwiększenia efektywności procedury otrzymywania oligodendrocytów z neuralnych komórek macierzystych pochodzących z krwi pępowinowej, skłoniła nas do kontynuowania badań z wykorzystaniem innych czynników, które mogą promować gliogenezę oraz/lub mieć wpływ na przeżywalność, proliferację i dojrzewanie komórek. Wśród testowanych związków znalazły się m.in. czynniki mitogenne (zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów: bFGF; płytkopochodne czynniki wzrostu: PDGF-AA, PDGF-BB), troficzne (neurotroficzny czynnik pochodzenia rzęskowego: CNTF; neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego: BDNF), trójiodotyronina (hormon T3) oraz czynniki o charakterze neuromorfogenów (kwas retinowy: RA, dwumaślan cyklicznego AMP: dBcAMP). Dzięki optymalnemu połączeniu poszczególnych związków, udało nam się ukierunkować *in vitro* różnicowanie neuralnych komórek macierzystych w neurony, astrocyty oraz oligodendrocyty. W ten sposób opracowane zostały protokoły służące do otrzymywania komórek o wybranym fenotypie neuralnym. Uzyskane populacje komórek wykorzystaliśmy następnie do przeprowadzenia badań neurotoksykologicznych, szczegółowo opisanych w publikacji noszącej tytuł:

A human stem cell-based model for identifying adverse effects of organic and inorganic chemicals on the developing nervous system. Buzanska L, Sypecka J, Nerini-Molteni S, Compagnoni A, Hogberg HT, del Torchio R, Domanska-Janik K, Zimmer J, Coccke S. (2009). *Stem Cells*: 27(10):2591-601

W przeprowadzonych testach toksykologicznych określiliśmy wpływ wybranych substancji, takich jak chlorpyrifos (składnik preparatów owadobójczych), metylowany chlorek rtęci (obecny w zanieczyszczonym środowisku, łatwo przenikający do organizmu i kumulujący się w szczególności w mózgu), chlorek kadmu (również składnik zanieczyszczonego środowiska,

pochodzący z odpadów technologicznych, np. pozostałych po barwieniu tkanin, produkcji akumulatorów i baterii, zabezpieczeń antykorozyjnych), telluryn sodu, L- oraz D-glutaminian, acetaminofen (inaczej paracetamol, popularny lek przeciwbólowy i przeciwgorączkowy) oraz teofilina (składnik m.in. leków stosowanych w chorobach oskrzeli) na przeżywalność poszczególnych typów komórek neuralnych. Przeprowadzone badania ujawniły zróżnicowaną wrażliwość neuronów, astrocytów i oligodendrocytów na testowane czynniki, a także wykazały przydatność hodowli komórkowych do przeprowadzania testów neurotoksykologicznych.

Obserwowana w *in vitro* znaczna podatność oligodendrocytów na działanie czynników zewnątrzkomórkowych zainspirowała mnie do przeprowadzenia eksperymentów *ex vivo* z wykorzystaniem organotypowych skrawków hipokampa. Skrawki organotypowe cechują się zachowaną strukturą tkanki i dzięki temu dobrze odzwierciedlają interakcje komórkowe oraz umożliwiają badanie procesów zachodzących *in situ*. Ten sposób współhodowli po raz pierwszy został zastosowany do badania właściwości i procesu różnicowania prekursorów oligodendrocytarnych, umożliwiając poszukiwanie odpowiedzi na pytanie o ich wrażliwość na czynniki pochodzenia tkankowego. Wyniki prowadzonych badań zostały zamieszczone w publikacji pod tytułem:

Crucial role of the local micro-environment in fate decision of neonatal rat NG2 progenitors. Sypecka J, Sarnowska A, Domanska-Janik K (2009), *Cell Prolif.* 42(5):661-71

Ponieważ najbardziej efektywna gliogeneza przypada na okres okołoporodowy, do badań wybrałam OPCs pochodzące z osesków (do 24 godzin *post partum*) szczura. Protokół izolowania i oczyszczania frakcji komórek oligodendrocytarnych opracowany został z myślą o unikaniu potencjalnych dodatkowych bodźców stymulujących. Wybarwione na zielono przy pomocy nieinwazyjnego znacznika komórek (CellTracker™ Green CMFDA) OPCs wysiewane były na powierzchnię organotypowych skrawków hipokampa i współhodowane przez następnych 7 dni bez kontaktu z pożywką hodowlaną. Taki sposób hodowli pozwalał wyeliminować wpływ czynników innych niż te, które pochodziły wyłącznie z tkanki nerwowej. Co niezwykle interesujące, już w ciągu pierwszych kilku godzin od umieszczenia znakowanych OPCs na powierzchni skrawków, obserwowaliśmy migrację tych komórek do wnętrza tkanki. W ciągu następnych kilku dni przeważająca liczba OPCs podlegała różnicowaniu w oligodendrocyty. Co ciekawe, około 10% spośród nasianych komórek dało początek astrocytom, charakteryzującym się typową dla nich strukturą morfologiczną oraz obecnością znaczników GFAP oraz S100 β . Najbardziej interesujące jednak okazało się

spostrzeżenie, że blisko 30 % OPCs zróżnicowało się w komórki o fenotypie neuronalnym, cechujące się ekspresją znaczników odpowiadających kolejnym etapom różnicowania się neuronów (NF200, NeuN, TUJ1, MAP2) i tworzące w kilku przypadkach struktury morfologicznie przypominające siatkę złożoną z 7-9 komórek. Inna niezwykle ciekawa obserwacja dotyczyła znamiennie dużej liczby OPCs (około 15%), które pomimo bezpośredniego kontaktu z mikrośrodowiskiem bogatym w czynniki stymulujące różnicowanie, pozostały w postaci progenitorów i cechowały się obecnością nestyny, uznawanej za znacznik neuralnych komórek macierzystych. Jednocześnie liczna frakcja tych komórek wykazywała aktywność proliferacyjną. Poczynione obserwacje pozwoliły sformułować hipotezę, że progenitory oligodendrocytarne, rozproszone w parenchymie mózgu, posiadają wiele cech typowych dla neuralnych komórek macierzystych.

Postawiona przeze mnie na podstawie uzyskanych wyników hipoteza zakładająca, że progenitory oligodendrocytarne są komórkami multipotencjalnymi i samoodnawiającymi się, a zatem posiadają cechy neuralnych komórek macierzystych, weryfikowana była w kolejnych badaniach, których wyniki zostały opublikowane w pracy zatytułowanej:

Differentiation of glia-committed NG2 cells: the role of factors released from hippocampus and spinal cord. Sypecka J, Sarnowska A, Gadomska-Szablowska I, Lukomska B, Domanska-Janik K. (2013) *Acta Neurobiol Exp* (Wars): 73(1): 117-130

Tym razem postawiłam sobie dwa kolejne pytania, wynikające z poprzednio poczynionych obserwacji. Pierwsze z nich dotyczyło natury sygnałów, które mają wpływ na różnicowanie OPCs: czy do indukcji neurogenety niezbędny jest bezpośredni kontakt między komórkami, czy też procesy te mogą być regulowane przez czynniki o charakterze parakrynnym? Drugie pytanie odnosiło się do wrażliwości OPCs na potencjalne zmiany lokalnego mikrośrodowiska. Założyłam, że skrawki organotypowe pochodzące z odległych rejonów OUN mogą wydzielać inne substancje (lub w odmiennych proporcjach), tworząc zróżnicowaną kompozycję sygnałów zewnątrzkomórkowych. Opierając się na powyższym założeniu, do dalszych badań wybrałam skrawki organotypowe hipokampa jako mikrośrodowisko typowo neurogenne oraz skrawki organotypowe rdzenia kręgowego, gdzie przypuszczalnie przeważają czynniki o charakterze gliogennym. Dodatkowo, w celu zbadania przeżywalności, ukierunkowania rozwojowego oraz dojrzewania progenitorów oligodendrocytarnych w warunkach patologicznych, skrawki hipokampa poddawane były uszkodzeniu OGD (z ang. *oxygen-glucose deprivation*). Model krótkotrwałego pozbawienia glukozy i tlenu (OGD) pozwala *ex vivo* naśladować procesy zachodzące podczas uszkodzenia ischemicznego i jest rutynowo

stosowany w Zakładzie Neurobiologii Naprawczej IMDiK. Tak wybrane trzy modele hodowli organotypowych posłużyły do badań komórek w tzw. współhodowlach pośrednich, w których kontakt między OPCs a umieszczonymi na membranach skrawkami możliwy był jedynie poprzez niewielką objętość pożywki hodowlanej. Wybrana pożywka hodowlana, pozbawiona jakichkolwiek suplementów, zapewniała zminimalizowanie niepożądanego wpływu dodatkowych substancji na badane procesy. Tak zaprojektowane doświadczenia pozwoliły uzyskać niezwykle ciekawe wyniki po 7 dniach współhodowli OPCs i skrawków tkanki nerwowej izolowanych z mózgu lub rdzenia kręgowego. Analiza immunocytochemiczna umożliwiła uzyskanie odpowiedzi na postawione pytanie o charakter czynników stymulujących neurogenezę, ponieważ w systemie współhodowli pośredniej ze skrawkami hipokampa, podobnie jak we wcześniejszych badaniach, blisko 30 % progenitorów oligodendrocytarnych różnicowało się w komórki o fenotypie neuronalnym. Co ciekawe, we współhodowli ze skrawkami pochodzącymi z rdzenia kręgowego, procent OPCs charakteryzujących się obecnością znaczników neuronalnych był znacznie niższy, a proces różnicowania pozostałych komórek progenitorowych w kierunku oligodendrocytów był wyraźnie spowolniony. Z kolei poddanie skrawków hipokampa uszkodzeniu OGD powodowało niemal całkowite zniesienie efektu neurogenego, zaś dojrzewanie oligodendrocytów (oceniane na podstawie ekspresji znaczników kolejnych etapów różnicowania, takich jak NG2, O4, GalC, MBP) przebiegało podobnie jak w kontroli (t.j. w takiej samej pożywce, lecz bez obecności skrawków). Przytoczone obserwacje pozwoliły uzyskać odpowiedź na drugie pytanie o różnicowanie mikrośrodowiska tkanki nerwowej i jego oddziaływanie na progenitory oligodendrocytarne. Przeprowadzone doświadczenia wykazały parakryny charakter sygnałów, które mają wpływ na ukierunkowanie rozwojowe i dojrzewanie OPCs. Potwierdzone jednocześnie zostały wyniki wcześniejszych badań, dotyczące zdolności OPCs do różnicowania się w trzy podstawowe typy komórek neuralnych oraz ich dużej podatności na bodźce zewnątrzkomórkowe. Poczynione obserwacje dotyczące parakryny modułacji wybranych procesów, którym podlegają progenitory oligodendrocytarne, otwierają także nowe możliwości farmakologicznego oddziaływania na los przeszczepianych komórek.

Podstawową zaletą przeszczepiania ukierunkowanych progenitorów w porównaniu z komórkami macierzystymi jest uniknięcie ryzyka nowotworzenia, będącego skutkiem niekontrolowanego namnażania się niezróżnicowanych komórek. Ze względu na szeroki wachlarz chorób neurodegeneracyjnych, którym towarzyszy wrodzony lub nabyty deficyt

oligodendrocytów, opracowanie terapii komórkowych opartych na suplementacji funkcjonalnymi OPCs wydaje się być niezwykle istotne. Jednak już z pierwszych doniesień literaturowych dotyczących progenitorów oligodendrocytarnych wynika, że jedną z głównych właściwości OPCs jest zdolność do różnicowania się *in vitro* także w astrocyty- stąd ich początkowa nazwa O-2A (z ang. *Oligodendrocyte/Type-2 astrocyte*) [22, 23]. Również od lat dyskutowany jest ewentualny udział endogennych komórek OPCs w tworzeniu tzw. blizny gлевой po urazach tkanki nerwowej [24, 25]. W dalszych badaniach odniosłam się do tego problemu, znajdując zastosowanie dla systemu współhodowli ze skrawkami organotypowymi pochodzącymi z hipokampa i z rdzenia kręgowego do oceny astrocytarnego ukierunkowania OPCs pod wpływem sygnałów pochodzących z tkanki nerwowej. Wyniki pracy badawczej opisane zostały w następującej publikacji:

Heterogeneity of local tissue microenvironment influences differentiation of oligodendroglial progenitors. Sypecka J, Sarnowska A (2013) *Folia Neuropathol*: 51(2): 103-110.

Z przeprowadzonych eksperymentów wynika, że duża frakcja progenitorów oligodendrocytarnych w hodowli *ex vivo* różnicuje się w astrocyty, przy czym w tym przypadku nie zaobserwowaliśmy istotnych statystycznie dysproporcji uzależnionych od typu hodowli organotypowej. Przeprowadzone doświadczenia sugerują, że po przeszczepie OPCs należy liczyć się z ewentualnym powstawaniem astrocytów pod wpływem rozpuszczalnych czynników pochodzenia tkankowego. Jednocześnie porównanie poziomu ekspresji 15 wybranych czynników troficznych w skrawkach hipokampa i rdzenia kręgowego wykazało, że poziom 9 spośród nich jest znamienne podwyższony w hipokampie, dwóch istotnie wyższy w skrawkach rdzenia kręgowego, a ekspresję 4 spośród badanych czynników odnotowano na tym samym poziomie. Przeprowadzone badania potwierdziły uprzednio sugerowaną niejednorodność mikrośrodowiska tkanki nerwowej i wskazały na substancje, które mogą odpowiadać za odmienny sposób różnicowania progenitorów gleyowych.

Ciekawa obserwacja, którą poczyniłam podczas eksperymentów opartych na współhodowli skrawków organotypowych z OPCs wskazywała, że mimo zastosowania restrykcyjnej pożywki hodowlanej, pozbawionej suplementów podnoszących wydajność hodowli *ex vivo*, zarówno kontrolne skrawki hipokampa, jak i te poddane procedurze OGD, znacznie dłużej zachowywały właściwą strukturę tkankową w obecności komórek OPCs. Nasunęło mi się wówczas przypuszczenie dotyczące potencjalnych neuroprotektoryjnych właściwości progenitorów oligodendrocytarnych. Jak wiadomo, komórki tworzące tkankę

oddziałują wzajemnie na siebie, a wydzielane przez nie czynniki przyczyniają się do utrzymywania lokalnej homeostazy. Również dane literaturowe wskazują, że próby przeszczepiania komórek macierzystych, bądź też wyizolowanych komórek progenitorowych, zakończyły się w ostatnich latach przynajmniej częściowym sukcesem - pewien procent komórek wykazywał zdolność migracji do ognisk demielinizacyjnych, różnicowania się i podejmowania procesu mielinogenezy [26, 27]. Co ciekawe, niezależnie od stopnia następującej remielinizacji (lub jej braku), najczęściej w pobliżu miejsc przeszczepu obserwowano wzmożone procesy regeneracyjne [28, 29]. Jak się obecnie przypuszcza, komórki macierzyste bądź progenitorowe mogą być źródłem specyficznych czynników aktywnych, modyfikujących lokalnie toczące się procesy zapalne lub/i neurodegeneracyjne (wywołane urazem lub też wrodzonymi/nabytymi zespołami chorobowymi) i tworzących w ten sposób mikrośrodowisko sprzyjające endogennym, naturalnym procesom regeneracyjnym [30, 31]. Opierając się na powyższych założeniach, a także uwzględniając obserwacje poczynione w trakcie moich wcześniejszych badań nad właściwościami progenitorów oligodendrocytarnych, zaplanowałam doświadczenia, które miały na celu sprawdzenie potencjału neuroprotekcynowego OPCs. Prowadzone eksperymenty polegały na współhodowli skrawków organotypowych hipokampa ze świeżo izolowanymi OPCs w warunkach kontaktu pośredniego. Dodatek jodku propidyny do współhodowli pozwalał na identyfikację martwych komórek i pomiar ich ilości. W skrawkach poddanych OGD, a następnie zastosowanych do współhodowli z OPCs zaobserwowano znamienne, ponad 40-procentowy spadek liczby martwych komórek zarówno po 24, jak i po 48 godzinach współhodowli. Po 72 godzinach spadek ten wynosił około 30 %. Obserwowany efekt skorelowany był z dynamiką dojrzewania komórek progenitorowych, które w ciągu 3 dni *in vitro* stopniowo różnicują się w niedojrzałe, pre-mielinizujące oligodendrocyty. Statystyczna analiza uzyskanych danych jednoznacznie wskazywała na znamienne neuroprotekcynowe właściwości progenitorów oligodendrocytarnych. W dalszych badaniach sprawdziliśmy, czy efekt neuroprotekcynowy wywierany przez progenitory oligodendrocytarne polega przede wszystkim na zwiększeniu przeżywalności neuronów w skrawkach hipokampa, czy również stymuluje proliferację komórek. W celu zidentyfikowania nowopowstałych komórek, do współhodowli dodawano znacznik BrdU, a następnie wykonywano barwienia immunohistochemiczne z wykorzystaniem przeciwciał pozwalających określić zarówno fenotyp komórek, jak i stopień ich zróżnicowania. Jak wykazaliśmy, przeważająca liczba komórek powstałych w skrawkach hipokampa podczas 7 dni współhodowli z OPCs miała charakter neuroblastów oraz komórek mikrogleju. Dzięki zastosowanej metodzie udało się jednoznacznie wykazać, że

współhodowla z progenitorami oligodendrocytarnymi ma znaczący wpływ na zwiększenie proliferacji komórek zarówno w kontrolnych skrawkach hipokampa, jak i tych uszkodzonych na skutek czasowego niedoboru glukozy i tlenu.

Uzyskane wyniki skłoniły nas do postawienia kolejnego pytania o rodzaj czynników mogących odpowiadać za obserwowane efekty. W poszukiwaniu odpowiedzi na to pytanie przeprowadziliśmy analizę molekularną mRNA wyizolowanego z OPCs. W tym celu zostały zaprojektowane i wykorzystane specyficzne startery dla wybranych czynników (w tym BDNF, GDNF, CNTF, interleukin, SCF). Aby przeprowadzić dokładną analizę, zastosowano także komercyjnie dostępne zestawy typu *microarrays* dla neurotrofin i ich receptorów. Dzięki zastosowaniu metody PCR w czasie rzeczywistym udało się ustalić poziom ekspresji wielu czynników aktywnych, które mogą przyczyniać się do modulacji procesów zachodzących w tkance. Uzyskane wyniki, normalizowane wobec 8 genów kontrolnych wykazały, że OPCs cechują się wysokim poziomem ekspresji mRNA wielu czynników odpowiedzialnych za wzajemne oddziaływania między komórkami, a także przyczyniających się do utrzymywania lokalnej homeostazy. Jednocześnie odnotowano wysoki poziom ekspresji mRNA dla receptorów substancji czynnych (w tym interleukin), co wskazuje na podatność badanych komórek na bodźce środowiskowe.

Analiza otrzymanych wyników nasunęła kolejne pytanie o rodzaj substancji, które są w rzeczywistości syntezowane i ulegają sekrecji, przyczyniając się do obserwowanego efektu neuroprotekcijnego/regeneracyjnego. Jest to zasadnicze zagadnienie z punktu widzenia potencjalnych terapii farmakologicznych. Ponieważ współhodowla z progenitorami oligodendrocytów skutkuje przede wszystkim zwiększeniem przeżywalności neuronów oraz stymulacją proliferacji komórek, do dalszych badań zostały wyselekcjonowane trzy substancje o odmiennym działaniu: neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego (ang. *brain-derived trophic factor*, BDNF), interleukina 10 (IL-10) oraz czynnik wzrostu komórek macierzystych (ang. *Stem Cell Factor*, SCF). BDNF jest substancją znaną ze swych właściwości neuroprotekcyjnych [32], jednak do tej pory nie wykazano, że źródłem jego sekrecji mogą być także oligodendrocyty. IL-10 jest czynnikiem o silnych właściwościach przeciwzapalnych [33], zaś SCF bierze udział m.in. w regulacji biologicznych funkcji komórek macierzystych [34, 35]. Prowadzone eksperymenty polegały na dodawaniu do pożywek hodowlanych specyficznych przeciwciał, neutralizujących wydzielane czynniki. Następnie oceniano w skrawkach stopień nekrozy, a także liczbę nowopowstałych, BrdU-dodatnich komórek. Uzyskane wyniki wykazały znamienne spadki liczby neuronów po zablokowaniu BDNF, zaś pomiar metodą ELISA wykazał, że źródłem BDNF-u

odpowiedzialnego za efekt neuroprotekcyny są zarówno oligodendrocyty, jak i skrawki hipokampa. Zablokowanie odpowiednio IL-10 oraz SCF skutkowało natomiast znaczącym zmniejszeniem liczby nowopowstałych komórek. Uzyskane wyniki zamieszczone zostały w publikacji noszącej tytuł:

The neuroprotective effect exerted by oligodendroglial progenitors on ischemically impaired hippocampal cells. Sypecka J, Sarnowska A (2013), *Molecular Neurobiology*, 48(2): DOI 10.1007/s12035-013-8549-9

W przeprowadzonych badaniach wykazano, że progenitory oligodendrocytów mają zdolność sekrecji czynników zaangażowanych w procesy zachodzące w uszkodzonej tkance, takich jak neuroprotekcja, stymulacja proliferacji komórek oraz modulacja lokalnej odpowiedzi immunologicznej. Wyniki badań molekularnych OPCs wskazują na wiele innych potencjalnych czynników, które mogą brać udział w ich odpowiedzi na bodźce zewnątrzkomórkowe. Należą do nich między innymi czynniki przekazywania sygnałów i aktywacji transkrypcji (STATs), interleukiny oraz czynniki troficzne (GDNF, CNTF), a także insulinopodobny czynnik wzrostu (IGF-1). Interesujące obserwacje poczynione podczas prowadzonych eksperymentów skłaniają do kontynuacji badań nad progenitorami glejowymi i nakreślają interesujące kierunki poszukiwań ich najbardziej pożądanych cech, zwłaszcza w dziedzinie neurobiologii naprawczej. Uzyskane wyniki przyczyniły się także do poszerzenia wiedzy podstawowej dotyczącej właściwości komórek oligodendrocytarnych oraz wzajemnych oddziaływań między komórkami tworzącymi tkankę nerwową.

Poznanie czynników hamujących i/lub odwracających procesy neurodegeneracyjne (takich jak czynniki troficzne, anty-zapalne, pro-/anty-apoptotyczne, neuromorfogeny) pozwoliłoby na ich zastosowanie terapeutyczne jako substancji wspierających przeszczepy komórkowe lub jako terapie farmakologiczne wspomagające procesy regeneracyjne. Jednocześnie możliwość wyboru komórek o najkorzystniejszych fenotypach, zwiększających szansę na podjęcie procesów remielinizacyjnych i jednocześnie będących źródłem naturalnych substancji czynnych o działaniu neuroprotekcynnym i/lub przeciwzapalnym, budzi nadzieję na opracowanie skutecznych terapii komórkowych dla chorób o podłożu leukodystroficznym.

Główne osiągnięcia wynikające z prowadzonych prac badawczych:

1. Wykazanie, że progenitory oligodendrocytarne, które powstają podczas najbardziej intensywnej gliogenezy (w okresie perinatalnym) posiadają wiele cech typowych dla neuralnych komórek macierzystych. Zaliczyć do nich można wysoki współczynnik proliferacji, multipotencjalność ocenianą jako zdolność do różnicowania się w trzy podstawowe typy komórek neuralnych oraz wydzielanie do przestrzeni zewnątrzkomórkowej substancji o charakterze neuroprotekcijnym i przeciwzapalnym.
2. Udokumentowanie dużej podatności OPCs na działanie bodźców zewnętrznych, zarówno fizjologicznych, jak i patologicznych, które decydują o ich przeżyciu i różnicowaniu oraz sekrecji czynników aktywnych. Jak wykazano, progenitory oligodendrocytarne cechują się szczególną wrażliwością na stres oksydacyjny, który najczęściej prowadzi do śmierci komórki. Podatność OPCs na działanie sygnałów zewnątrzkomórkowych wiąże się ze zróżnicowanym przebiegiem procesu ich dojrzewania i zdolności do syntezy składników mieliny. Jednocześnie w określonych warunkach, mikrośrodowisko bogate w bodźce stymulujące może promować różnicowanie OPCs w kierunku komórek o fenotypie neuronalnym bądź astrocytarnym. Poznanie charakteru wybranych czynników, które decydują o ukierunkowaniu i dojrzewaniu progenitorów oligodendrocytarnych pozwala promować procesy pożądane (np. wzmocnienie potencjału mielinizacyjnego) i ograniczać procesy niekorzystne dla regeneracji tkanki (np. różnicowanie astrocytarne, które przyczynia się do tworzenia blizny gliejowej i uniemożliwia zastosowanie dostępnych lub opracowywanych terapii).
3. Określenie udziału wybranych składników macierzy zewnątrzkomórkowej oraz metaloproteinaz z rodziny żelatynaz w procesie gliogenezy i dojrzewania oligodendrocytów. Jak wykazano, laminina oraz fibronektyna stymulują *in vitro* proces różnicowania neuralnych komórek macierzystych w oligodendrocyty. Wiąże się to z aktywacją MMP2/MMP9 w komórkach progenitorowych oraz wydzielaniem żelatynaz do przestrzeni międzykomórkowej. Poczynione obserwacje poszerzają wiedzę dotyczącą mechanizmów różnicowania oligodendrocytów i są przydatne do opracowania protokołów otrzymywania komórek o tym fenotypie.

4. Opracowanie metody otrzymywania oligodendrocytów z neuralnych komórek macierzystych pochodzących z ludzkiej krwi pępowinowej. Protokół przygotowany z myślą o możliwości wykorzystania opracowanej procedury w terapiach klinicznych opiera się na zastosowaniu czynników będących komercyjnymi odpowiednikami substancji fizjologicznych (np. PDGF-AA, T3), przypuszczalnie mających udział w regulacji procesu gliogenezy *in vivo* i jednocześnie unika stosowania komponentów pochodzenia odzwierzęcego (w tym surowicy mogącej zawierać patogeny). Uzyskana frakcja komórek oligodendrocytarnych została z powodzeniem zastosowana do testowania *in vitro* leków i czynników potencjalnie toksycznych (w tym składników preparatów ochrony roślin czy też substancji używanych w przemyśle i powszechnie obecnych w życiu codziennym).

5. Opisanie neuroprotektoryjnych właściwości progenitorów oligodendrocytarnych. Zidentyfikowane przez nas czynniki o charakterze parakrynnym wydzielane przez OPCs (BDNF, SCF oraz IL-10) znacząco wpływają na zwiększenie przeżywalności neuronów oraz stymulują proliferację. Wśród nowopowstałych komórek przeważają neuroblasty oraz komórki mikrogleju, będące efektorami odpowiedzi immunologicznej. Przeprowadzone badania wskazują także na inne potencjalne czynniki, które mogą być wydzielane przez OPCs i mieć działanie neuroprotektoryjne i przeciwzapalne. Uzyskane wyniki udowadniają, że OPCs posiadają cechy zarówno neuralnych komórek macierzystych, jak i ukierunkowanych progenitorów, co jest istotnym odkryciem z punktu widzenia terapii regeneracyjnych. Zastosowanie progenitorów oligodendrocytarnych do przeszczepów komórkowych pozwala zwiększyć szansę na wzbudzenie procesów remielinizacyjnych i jednocześnie uzyskać korzyści płynące z dostarczania substancji troficznych i przeciwzapalnych, charakterystycznych dla komórek macierzystych. Wśród potencjalnych efektów przeszczepiania OPCs można oczekiwać przynajmniej częściowego ograniczenia procesu neurodegeneracji i reakcji zapalnych w tkance. Wydzielane substancje o charakterze troficznym mogą z kolei przyczyniać się do tworzenia mikrośrodowiska sprzyjającego mobilizacji i zwiększeniu przeżywalności endogennych prekursorów i/lub różnicowania przeszczepionych komórek. Podjęcie funkcji mielinizacyjnych byłoby finalnym, najbardziej oczekiwanym efektem przeszczepiania progenitorów oligodendrocytarnych.

Podsumowując, uzyskane wyniki badań właściwości OPCs i ich odpowiedzi na czynniki fizjologiczne i patologiczne obecne w mikrośrodowisku tkankowym przyczyniają się do

pełniejszej charakterystyki oligodendrocytów i mogą posłużyć do opracowania skutecznych terapii chorób o charakterze leukodystroficznym.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

Po ukończeniu Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego, rozpoczęłam studia doktoranckie pod kierunkiem pani Profesor Krystyny Domańskiej-Janik w Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN. Budowa i funkcjonowanie układu nerwowego fascynowały mnie od wielu lat. W Zakładzie Neurochemii zyskałam możliwość prowadzenia badań nad występującą u królików dziedziczną chorobą neurodegeneracyjną o charakterze leukodystrofii. Choroba, której głównymi objawami były drżenie kończyn, głowy i tułowia oraz spastyczne porażenie kończyn, została opisana przez profesor Ewę Osetowską z Zespołu Zakładu Hodowli Zwierząt Doświadczalnych PAN w Łomnie. Charakterystyczne objawy choroby przyczyniły się do nadania jej nazwy *Pt* (skrót od angielskiego terminu *paralytic tremor*, tłumaczonego jako *drżączka porażna*) [36]. Szczegółowe badania prowadzone przez profesor Osetowską w stworzonym przez nią Ośrodku Neurologii Porównawczej przy CMDiK PAN umożliwiły zidentyfikowanie choroby *Pt* jako leukodystrofii recesywnej, przenoszonej z chromosomem X. Co ciekawe, obserwowanej hypomielinizacji, cechującej się nieprawidłowo wykształconą, cienką osłonką mielinową lub jej zupełnym brakiem w przypadku włókien nerwowych o mniejszej średnicy, nie towarzyszył spadek liczby oligodendrocytów [37]. W tkance nerwowej królików obarczonych chorobą *Pt* (zwanymi także królikami *pt*) obserwowano jednak występowanie głównie niedojrzałych oligodendrocytów, często w ich progenitorowej formie [38]. Dzięki dalszym badaniom prowadzonym przez profesor Krystynę Domańską-Janik, udało się we współpracy z Zespołem Laboratorium Neurochemii Uniwersytetu w Lozannie zidentyfikować przyczynę genetyczną choroby, którą jest mutacja punktowa w genie *plp*, kodującym jeden z głównych składników mieliny [39].

Opierając się na dotychczasowej wiedzy o leukodystrofii *pt*, prowadziłam kilkuletnie badania na poziomie molekularnym i biochemicznym nad wpływem tej mutacji na biosyntezę innych składników mieliny, ich transport wewnątrzkomórkowy, formowanie osłonki mielinowej oraz nad korelacją różnorodności fenotypowej cechującej chorobę *pt* ze stopniem hypomielinizacji OUN. Już w pierwszych latach studiów doktoranckich kierowałam grantem badawczym, zatytułowanym „Różnorodność fenotypowa a ekspresja genów białek mielinowych u mutantu królika”. Wnikliwa analiza uzyskanych wyników pozwoliła m.in. na

ocnę królika *pt* jako odpowiedniego modelu zwierzęcego odzwierciedlającego występującą u ludzi chorobę Pelizaeusa-Merzbachera [40, 41]. Wyniki wielokierunkowych badań zostały opublikowane w 6 artykułach w czasopismach anglojęzycznych [punkt 5.1.1] oraz prezentowane były w postaci 14 komunikatów zjazdowych (w tym 5 z nich ukazało się w renomowanych czasopismach anglojęzycznych). Wyniki prowadzonych badań stanowiły przedmiot mojej pracy doktorskiej zatytułowanej: „Plejotropowe oddziaływanie mutacji genu PLP u królika *Pf*” (promotor: Prof. dr hab. Krystyna Domańska-Janik). Rozprawa została nagrodzona wyróżnieniem Rady Naukowej CMDiK PAN oraz wyróżnieniem w konkursie im. Aurelii Baczko na najlepszą pracę doktorską w dziedzinie nauk medycznych w 1996 roku. Za osiągnięcia naukowe zostałam także nagrodzona rocznym Stypendium dla Młodych Naukowców, przyznany przez Fundację na Rzecz Nauki Polskiej.

Po obronie pracy doktorskiej prowadziłam dalsze badania choroby *pt*, ze szczególnym uwzględnieniem jej analogii z występującą u ludzi dziedziczną chorobą Pelizaeusa-Merzbachera. Zagadnieniu temu poświęcone są moje trzy następne publikacje [punkt 5.1.2-(1, 4 oraz 6)], zaś kolejna opublikowana praca opisuje wtryfikację zarodków królika *pt*, dokonaną z inicjatywy pani prof. Krystyny Domańskiej-Janik przez specjalistów z Instytutu Genetyki i Hodowli Zwierząt Polskiej Akademii Nauk w Jastrzębcu, w celu zachowania tej unikalnej mutacji do przyszłych badań [punkt 5.1.2-(3)].

Prowadzone podczas studiów doktoranckich badania mechanizmu mielinogenyzy i wpływu jego zaburzeń na dojrzewanie oligodendrocytów wzbudziło we mnie zainteresowanie funkcjonowaniem tych komórek, procesem gliogenezy oraz poszukiwaniem możliwości naprawy uszkodzonej tkanki nerwowej. Część pracy eksperymentalnej, prowadzonej w Zakładzie Neurobiologii Naprawczej IMDiK PAN, dotyczyła poszukiwania źródeł komórek progenitorowych oligodendrocytów w celu wykorzystania ich do potencjalnych terapii regeneracyjnych [punkt 5.1.2-(13)]. W ten sposób moje zainteresowanie zwróciło się w kierunku neuralnych komórek macierzystych, w szczególności pochodzących z ludzkiej krwi pępowinowej. Zaangażowałam się w projekty naukowe mające na celu charakterystykę *in vitro* neuralnych komórek macierzystych linii HUUCB-NSC, ze szczególnym uwzględnieniem podatności na bodźce decydujące o ich przycięciu [punkt 5.1.2-(5)], proliferacji i różnicowaniu [punkt 5.1.2-(10 oraz 11)]. Dalsze badania, które trwają do dziś, miały na celu określenie potencjału terapeutycznego komórek pochodzących z ludzkiej krwi pępowinowej w leczeniu skutków uszkodzeń OUN [punkt 5.1.2-(12)]. Poszukując potencjalnych źródeł komórek glejowych na potrzeby terapii komórkowej, brałam udział w zakończonej sukcesem próbie otrzymania indukowanych pluripotentnych komórek macierzystych [punkt 5.1.2-(15)],

stwarzającej nowe perspektywy dla medycyny spersonalizowanej. Obecnie w ramach współpracy z dr Anną Sarnowską, do swej pracy naukowej włączyłam eksperymenty dotyczące badań ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących z galarety Whartona, izolowanej ze sznura pępowinowego (komunikat zjazdowy na konferencji XI European Meeting on Glial Cells in Health and Disease, 2013) [42].

Piśmiennictwo:

1. Trotter J, Karram K, Nishiyama A. NG2 cells: Properties, progeny and origin. *Brain Res Rev.* 2010; 63(1-2):72-82
2. Costello DJ, Eichler AF, Eichler FS. Leukodystrophies: classification, diagnosis, and treatment. *Neurologist.* 2009; 15 (6):319-28
3. Kohlschütter A, Bley A, Brockmann K, Gärtner J, Krägeloh-Mann I, Rolfs A, Schöls Leukodystrophies and other genetic metabolic leukoencephalopathies in children and adults. *Brain Dev.* 2010, 32 (2): 82-9
4. Al-Hasani OH, Smith C. Traumatic white matter injury and toxic leukoencephalopathies. *Expert Rev Neurother.* 2011; 11(9): 1315-24
5. Dewar D, Underhill SM, Goldberg MP: Oligodendrocytes and ischemic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2003; 23: 263-74
6. Devivo MJ. Epidemiology of traumatic spinal cord injury: trends and future implications. *Spinal Cord.* 2012; 50(5): 365-72
7. Borganzon E.R. Induction of oligodendrocyte fate during the formation of the vertebrate neural tube. *Neurochem. Res.* 2002; 27:1361-1369
8. Dessaud E, McMahon AP, Briscoe J: Pattern formation in the vertebrate neural tube: a sonic hedgehog morphogen-regulated transcriptional network. *Development.* 2008; 135: 2489-503
9. Chalazonitis A, D'Autréaux F, Pham TD, Kessler JA, Gershon MD: Bone morphogenetic proteins regulate enteric gliogenesis by modulating ErbB3 signaling. *Dev Biol.* 2011; 350: 64-79
10. Barber BA, Rastegar M: Epigenetic control of Hox genes during neurogenesis, development, and disease. *Ann Anat.* 2010; 20: 261-74
11. Balaskas N, Ribeiro A, Panovska J, Dessaud E, Sasai N, Page KM, Briscoe J, Ribes V: Gene regulatory logic for reading the Sonic Hedgehog signaling gradient in the vertebrate neural tube. *Cell.* 2012; 148: 273-84
12. Ulloa F, Martí E: Wnt won the war: antagonistic role of Wnt over Shh controls dorso-ventral patterning of the vertebrate neural tube. *Dev Dyn.* 2010; 239: 69-76
13. Kessar N, Fogarty M, Iannarelli P, Grist M, Wegner M, Richardson WD: Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nat Neurosci.* 2006; 9: 173-9
14. Dawson MR, Polito A., Levine JM, Reynolds R (2003) NG2-expressing glial progenitor cells: an abundant and widespread population of cycling cells in the adult rat CNS. *Mol. Cell. Neurosci.* 2003; 24: 476-488
15. Horner P.J., Thallamir M., Gage F.H. Defining the NG2-expressing cell in the adult CNS. *J. Neurocytol.* 2002; 31: 469-480
16. Gonzalez-Perez O, Alvarez-Buylla A. Oligodendrogenesis in the subventricular zone and the role of epidermal growth factor. *Brain Res Rev.* 2011, 24;67(1-2):147-56.

17. Nait-Oumesmar B, Decker L, Lachapelle F., Avellana-Adalid V, Bachelin C, Baron-Van Evercooren A: Progenitor cells of the adult mouse subventricular zone proliferate, migrate and differentiate into oligodendrocytes after demyelination. *Eur J Neurosci*, 1999, 11, 4357-4366.
18. Simon C, Götz M, Dimou L (2011) Progenitors in the adult cerebral cortex: cell cycle properties and regulation by physiological stimuli and injury. *Glia* 59:869-81
19. Keirstead HS, Levine JM, Blakemore WF: Response of the oligodendrocyte progenitor cell population (defined by NG2 labelling) to demyelination of the adult spinal cord. *Glia*, 1998, 22, 161-170.
20. Buser JR, Maire J, Riddle A, Gong X, Nguyen T, Nelson K, Luo NL, Ren J, Struve J, Sherman LS, Miller SP, Chau V, Henderson G, Ballabh P, Grafe MR, Back SA: Arrested preoligodendrocyte maturation contributes to myelination failure in premature infants. *Ann Neurol*, 2012; 71: 93-109
21. Domanska-Janik K, Buzanska L, Lukomska B. A novel, neural potential of non-hematopoietic human umbilical cord blood stem cells. *Int J Dev Biol*. 2008; 52(2-3): 237-48
22. Raff MC, Miller RH, Noble M. A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium. *Nature* 1983; 303: 390-396
23. Noble M, Murray K, Stroobant P, Waterfield MD, Riddle P. Platelet derived growth factor promotes division and motility and inhibits premature differentiation of the oligodendrocyte/type-2 astrocyte progenitor cell. *Nature* 1988; 333: 560-562
24. RC, Lau LW, Keough MB, Midha R, Apte SS, Yong VW. Overcoming neurite-inhibitory chondroitin sulfate proteoglycans in the astrocyte matrix. *Glia*. 2013; 61(6):972-84
25. Ketschek AR, Haas C, Gallo G, Fischer I. The roles of neuronal and glial precursors in overcoming chondroitin sulfate proteoglycan inhibition. *Exp Neurol*. 2012; 235(2): 627-37.
26. Chari DM, Blakemore WF: Efficient recolonisation of progenitor-depleted areas of the CNS by adult oligodendrocyte progenitor cells. *Glia*, 2002; 3: 307-313
27. Windrem M.S., Nunes M.C., Rashbaum W.K., Schwartz T.H., Goodmann R.A., McKhann G., Goldman S.A. Fetal and adult human oligodendrocyte progenitor cell isolates myelinate the congenitally dysmyelinated brain. *Nat. Med.* 2004; 10: 93-97
28. Bottai D, Cigognini D, Madaschi L, Adami R, Nicora E, Menarini M, Di Giulio AM, Gorio A. Embryonic stem cells promote motor recovery and affect inflammatory cell infiltration in spinal cord injured mice. *Exp Neurol*. 2010; 223(2): 452-63
29. Hooshmand MJ, Sontag CJ, Uchida N, Tamaki S, Anderson AJ, Cummings BJ. Analysis of host-mediated repair mechanisms after human CNS-stem cell transplantation for spinal cord injury: correlation of engraftment with recovery. *PLoS One*. 2009; 4(6): e5871
30. Tajiri N, Kaneko Y, Shinozuka K, Ishikawa H, Yankee E, McGrogan M, Case C, Borlongan CV. Stem cell recruitment of newly formed host cells via a successful seduction? Filling the gap between neurogenic niche and injured brain site. *PLoS One*. 2013; 8(9): e74857
31. Pluchino S, Cossetti C. How stem cells speak with host immune cells in inflammatory brain diseases. *Glia*. 2013; 61(9):1379-401
32. Choi SH, Li Y, Parada LF, Sisodia SS Regulation of hippocampal progenitor cell survival, proliferation and dendritic development by BDNF. *Mol Neurodegener* 2009; 4: 52-64
33. Yang J, Jiang Z, Fitzgerald DC, Ma C, Yu S, Li H, Zhao Z, Li Y, Ciric B, Curtis M, Rostami A, Zhang GX Adult neural stem cells expressing IL-10 confer potent immunomodulation and remyelination in experimental autoimmune encephalitis. *J Clin Invest* 2009; 119(12):3678-91
34. Erlandsson A, Larsson J, Forsberg-Nilsson K. Stem cell factor is a chemoattractant and a survival factor for CNS stem cells. *Exp Cell Res* 2004; 301: 201-10
35. Gore BB, Wong KG, Tessier-Lavigne M Stem cell factor functions as an outgrowth-promoting factor to enable axon exit from the midline intermediate target. *Neuron* 2008; 57(4): 501-10

36. Osetowska E., Luszawski F. Introduction to investigation of hereditary disease of the nervous system on *pt* rabbit model (in Polish). *Neuropatol. Pol.* 1975;13: 61-70
37. Zelman I., Taraszewska A. Pathology of myelin in *pt* rabbit (in Polish). *Neuropathol. Pol.* 1984; 22: 205-218.
38. Taraszewska A, Zelman IB. Ultrastructural pattern of brain aging in normal rabbit and in *pt* mutant. *Neuropatol Pol.* 1992; 30(3-4): 271-83
39. Tosic M, Dolivo M, Domańska-Janik K, Matthieu JM. Paralytic tremor (*pt*): a new allele of the proteolipid protein gene in rabbits. *J Neurochem.* 1994; 63(6): 2210-6
40. Hudson LD. Pelizaeus-Merzbacher disease and spastic paraplegia type 2: two faces of myelin loss from mutations in the same gene. *J Child Neurol.* 2003; 18(9): 616-24
41. Garbern JY. Pelizaeus-Merzbacher disease: Genetic and cellular pathogenesis. *Cell Mol Life Sci.* 2007; 64(1):50-65.
42. J Sypecka, A Sarnowska Neuroprotective properties of glia-committed NG2-positive cells: comparison with uncommitted mesenchymal stem cells derived from Wharton jelly. *GLIA* 2013, 61: S55

5.1. Lista publikacji:

Lista moich dotychczasowych osiągnięć to 24 artykuły opublikowane w anglojęzycznych czasopismach indeksowanych w bazie ISI Web of Science, z czego 21 to prace oryginalne. W 15 z wymienionych prac jestem pierwszym autorem, natomiast w 4 występuję jako drugi współautor. Sumaryczny współczynnik oddziaływania (wg Journal Citation Reports, zgodnie z rokiem opublikowania) wynosi 44.505 (punktacja KBN/MNiSW=385). Całkowita liczba cytowań (wg bazy ISI Web of Science) wynosi 132, zaś indeks Hirscha = 7.

5.1.1. Prace opublikowane przed uzyskaniem stopnia doktora

1. **Sypecka J.**, Tosic M., Dolivo M., Domańska-Janik K., Matthieu J.-M. (1993): Developmental expression of major myelin specific proteins in hypomyelinated *pt* mutant rabbit. *Acta Neurobiol. Exp.* 53, 281-284
IF= 0,413; 5-letni IF=1,804; MNiSW=7
2. **Sypecka J.**, Domańska-Janik K. (1995): Expression of myelin specific proteins during development of normal and hypomyelinated *pt* mutant rabbits: studies on the brain homogenates. *Mol. Chem. Neuropathol.* 26: 53-66
IF= 1,151; MNiSW=9
3. **Sypecka J.**, Domańska-Janik K. (1995): Expression of myelin specific proteins during development of normal and hypomyelinated *pt* mutant rabbits: studies of the purified myelin. *Mol. Chem. Neuropathol.* 26: 67-78
IF= 1,151; MNiSW=9

4. **Sypecka J.**, Gajkowska B., Domańska-Janik K. (1995): Oligodendrocyte development in plp *pt* mutant rabbits: Glycolipid antigens and plp gene expression. *Metabolic Brain Disease* Vol. 10, No.4 : 321-333
IF= 0,630; 5-letni IF= 2.680; MNiSW=8
5. **Sypecka J.** (1996): Pt point mutation in plp gene results in hyperexpression of MOG in hypomyelinated rabbit. *Acta Neurobiol.Exp.* 56: 9-14.
IF= 0.480; 5-letni IF= 1,804, MNiSW=7
6. **Sypecka J.**, Domańska-Janik K. (1996): Hypomyelinated *pt* mutant rabbit as a new model of Pelizaeus-Marzbacher disease. *Neurolog Neurochir. Pol.* , 30 (XLVI), supl.2, 43-47
MNiSW=5

5.1.2. Prace opublikowane po uzyskaniu stopnia doktora

1. Domańska-Janik K, **Sypecka J.**, Taraszewska A.(1997) Immunohistochemical study of myelin-specific proteins in *pt* rabbits. *Folia Neuropathol.* 35(1):1-7.
5-letni IF=1,204; MNiSW=8
2. **Sypecka J.** (2003) Different vulnerability to cytotoxicity and susceptibility to protection of progenitors versus mature oligodendrocytes. *Pol. J. Pharmacol.*, 55, 881-885 (obecnie *Pharmacological reports*)
IF=0.829; 5-letni IF=2.223; MNiSW=8
3. Papis K, **Sypecka J.**, Korwin-Kossakowski M, Wenta-Muchalska E, Biliska B. (2005) Banking of embryos of mutated, paralytic tremor rabbit by means of vitrification. *Lab Anim.*, 39 (3): 284-9.
IF=0,37; 5-letni IF= 1,519; MNiSW=15
4. **Sypecka J.** , Domańska-Janik K. (2005) Rabbit paralytic tremor phenotype-a plp1 gene mutation as a model of human Pelizaeus-Merzbacher disease. *Acta Neurobiol Exp* (2): 221-9
IF=1.209, 5-letni IF=1,804; MNiSW=10
5. Bużańska L., Habich A., Jurga M., **Sypecka J.**, Domańska-Janik K. (2005) Human cord blood-derived neural stem cell line-possible implementation in studying neurotoxicity. *Toxicol In Vitro* 19(7): 991-9
IF=1.754, 5-letni IF= 2.716; MNiSW=15
6. **Sypecka J.** Domańska-Janik K. (2006) Phenotypic diversity resulting from a point mutation in a PLP gene in paralytic tremor rabbit. *Folia Neuropathol.* 44 (4): 244-50.
IF= 0, 975, 5-letni IF=1,204; MNiSW=10
7. **Sypecka J.**, Sarnowska A, Domanska-Janik K (2009) Crucial role of the local micro-environment in fate decision of neonatal rat NG2 progenitors. *Cell Prolif.* 42(5):661-71.
IF=2.917, 5-letni IF= 2.818; MNiSW=32

8. Buzanska L, **Sypecka J**, Nerini-Molteni S, Compagnoni A, Hogberg HT, del Torchio R, Domanska-Janik K, Zimmer J, Coecke S. (2009). A human stem cell-based model for identifying adverse effects of organic and inorganic chemicals on the developing nervous system. *Stem Cells*: 27(10):2591-601.
IF=7.747, 5-letni IF= 8.368; MNiSW=45
9. **Sypecka J**, Dragun-Szymczak P, Zalewska T, Domańska-Janik K. (2009) Laminin promotes oligogliogenesis and increases MMPs activity in human neural stem cells of HUCB-NSC line. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*: 69(1):37-45.
IF=1.337, 5-letni IF=1,804; MNiSW=13
10. Szymczak P, Wojcik-Stanaszek L, **Sypecka J**, Sokolowska A, Zalewska T. (2010) Effect of matrix metalloproteinases inhibition on the proliferation and differentiation of HUCB-NSCs cultured in the presence of adhesive substrates. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*: 70(4):325-36.
IF=1.533, 5-letni IF=1,804; MNiSW=13
11. Inga Markiewicz, **Joanna Sypecka**, Krystyna Domanska-Janik, Tomasz Wyszomirski, Barbara Lukomska (2011) Cellular Environment Directs Differentiation of Human Umbilical Cord Blood - derived Neural Stem Cells in vitro *J Histochem Cytochem*: 59(3) 289-301
IF=2,725, 5-letni IF= 2.534; MNiSW=20
12. Górnicka-Pawlak E, Janowski M, Habich A, Jablonska A, Drela K, Kozłowska H, Lukomska B, **Sypecka J**, Domanska-Janik K(2011): Systemic treatment of focal brain injury in the rat by human umbilical cord blood cells being at different level of neural commitment.. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*:46-64.
IF=2.11, 5-letni IF=1,804; MNiSW=15
13. **Sypecka J**. (2011) Searching for oligodendrocyte precursors for cell replacement therapies. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*: 71(1):94-102.
IF=2.11, 5-letni IF=1,804; MNiSW=15
14. Wójcik-Stanaszek L, **Sypecka J**, Szymczak P, Ziemka-Nalecz M, Khrestchatisky M, Rivera S, Zalewska T. (2011) The potential role of metalloproteinases in neurogenesis in the gerbil hippocampus following global forebrain ischemia. *PLoS One*: 6(7): e22465.
IF=4.092, 5-letni IF= 4.244; MNiSW=40
15. Szablowska-Gadomska I, **Sypecka J**, Zayat V, Podobinska M, Pastwinska A, Pienkowska-Grela B, Buzanska L. (2012) Treatment with small molecules is an important milestone towards the induction of pluripotency in neural stem cells derived from human cord blood. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*: 72(4):337-50.
IF=1,977, 5-letni IF= 1,804; MNiSW=15
16. **Sypecka J**, Sarnowska A, Gadomska-Szablowska I, Lukomska B, Domanska-Janik K: Differentiation of glia-committed NG2 cells; the role of factors released from hippocampus and spinal cord.(2013) *Acta Neurobiol Exp (Wars)*: 73(1):117-130
IF=1.977, 5-letni IF=1,804; MNiSW=15

17. **Sypecka J, Sarnowska A. (2013):** Heterogeneity of local tissue microenvironment influences differentiation of oligodendroglial progenitors. *Folia Neuropathol.* 51(2): 103-110.
IF=1.547, 5-letni IF=1,204; MNiSW=20
18. **Sypecka J, Sarnowska A (2013):** The neuroprotective effect exerted by oligodendroglial progenitors on ischemically impaired hippocampal cells. *Molecular Neurobiology* 48 (2) DOI 10.1007/s12035-013-8549-9
IF=5.471, 5-letni IF= 5.535 , MNiSW=35

5.1.3. Komunikaty zjazdowe

Wyniki prowadzonych prac badawczych przedstawione zostały w postaci 57 komunikatów podczas konferencji i sympozjów naukowych krajowych (9) i międzynarodowych (48) (Załącznik 4).

5.1. 4 Rozdziały w książkach:

Sypecka J. Domańska-Janik K. (1997): "Major myelin specific genes expression in pt plp gene mutant rabbit", w książce zatytułowanej: "Neurochemistry: cellular, molecular and clinical aspects". 233-239, ed. Teelken and Korf, Plenum Press, New York ISBN-0-306-45705-9
MNiSW=5

Sypecka J (2012) "Gliogeneza w ośrodkowym układzie nerwowym". W „GLEJ” – Skrypt XXIX Zimowej Szkoły Instytutu Farmakologii PAN”, ISBN 978-83-60270-21-9
MNiSW=4

5.2. Nagrody za pracę badawczą:

- 2012-Nagroda Naukowa za publikację o wysokim IF, przyznana przez Dyrektora IMDIK PAN
- 2010-Nagroda Naukowa za publikację o wysokim IF, przyznana przez Dyrektora IMDIK PAN
- 1997-roczne Stypendium dla Młodych Naukowców przyznane przez Fundację na Rzecz Nauki Polskiej
- 1997-wyróżnienie w konkursie im. Aurelii Baczko na najlepszą pracę doktorską w dziedzinie nauk medycznych w 1996 roku
- 1996-Nagroda Dyrektora Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN

za osiągnięcia naukowe w 1995 roku

1996-Wyróżnienie za pracę doktorską: "Pleiotropowe oddziaływanie mutacji genu PLP u królika Pt", przyznane przez Radę Naukową IMDiK PAN

5.3. Informacja o osiągnięciach w działalności dydaktycznej, współpracy naukowej i popularyzacji nauki

Poza zaangażowaniem w pracę badawczą, rozwijam swoje umiejętności uczestnicząc w certyfikowanych kursach i szkoleniach, przede wszystkim dotyczących nowych technik biologii molekularnej. Wiedzę naukową poszerzam biorąc udział w licznych seminariach, spotkaniach i konferencjach, krajowych oraz zagranicznych. Jednocześnie przyczyniam się do popularyzacji wiedzy z zakresu procesów gliogenezy, właściwości komórek glejowych, a także zastosowania komórek macierzystych w naukach biomedycznych. Między innymi uczestniczyłam jako wykładowca w Szkole Zimowej Instytutu Farmakologii PAN, zatytułowanej "Glej" (2012), zorganizowałam sesję poświęconą komórkom glejowym w ramach XI Międzynarodowego Sympozjum pt. "Molekularne podstawy patologii i terapii schorzeń neurologicznych" (2013), a także dzieliłam się wiedzą dotyczącą technik hodowli *in vitro* oraz *ex vivo* w ramach wykładów dla uczestników Studiów Doktoranckich IMDiK PAN. Od 2013 roku jestem koordynatorem merytorycznym z ramienia IMDiK PAN (Partner Projektu) w Zespole zarządzającym projektem „Nowoczesne metody, leki i terapie w ochronie zdrowia i gospodarce Europy XXI wieku – interdyscyplinarne kształcenie w obszarze nauk biomedycznych na studiach II i III stopnia” (www.biol.uw.edu.pl/nowbiolmed). Projekt ma na celu m.in. wprowadzenie do programu nauczania najnowszej wiedzy z zakresu neurobiologii oraz biologii komórek macierzystych i ich potencjału terapeutycznego. W ramach dzielenia się zdobytą wiedzą oraz doświadczeniem, wraz z pozostałymi członkami Zespołu sprawowałam opiekę nad praktykantami, licencjuszami, magistrantami oraz doktorantami prowadzącymi prace badawcze w Zakładzie Neurobiologii Naprawczej IMDiK PAN. Sprawowałam m.in. opiekę naukową nad:

- pracą doktorską mgr Elżbiety Pawlak, zatytułowaną: „Efekty funkcjonalne systemowego przeszczepiania komórek krwi pępowinowej u szczurów po uszkodzeniu mózgu:”- promotor Prof. dr. hab. Krystyna Domańska-Janik. Obrona pracy doktorskiej-czerwiec 2011
- pracą doktorską mgr. inż. Ilony Szablowskiej-Gadomskiej, zatytułowaną: "Indukcja pluripotencjalności i różnicowania neuralnych komórek progenitorowych z ludzkiej krwi pępowinowej: rola czynników epigenetycznych i obniżonego stężenia tlenu"- promotor

Prof. dr hab. Leonora Buzanska. Obrona pracy doktorskiej-wrzesień 2013.

5.4. Długoterminowe staże zagraniczne:

1992: 8- miesięczny pobyt w Laboratorium Neurochemicznym Oddziału Pediatrycznego Szpitala Uniwersyteckiego, Uniwersytetu w Lozannie (Laboratoire de Neurochimie, Service de Pédiatrie, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois-CHUV), Szwajcaria. Badania naukowe pod kierunkiem profesora Jean-Marie Matthieu nad molekularnym podłożem chorób dysmielinizacyjnych

5.5. Recenzowanie artykułów dla czasopism anglojęzycznych:

Cytotherapy (IF= 3.275)

Food and Chemical Toxicology (IF= 3.215)

Molecules (IF=2.679)

Journal of Neuroscience Methods (IF= 2.484)

Acta Neurobiologiae Experimentalis (IF=1,977)

5.6. Współpraca międzynarodowa

Prof. Jean-Marie Matthieu (Laboratoire de Neurochimie, Service de Pédiatrie, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois-CHUV, Szwajcaria.). Badania nad mechanizmami biosyntezy składników mieliny i wyjaśnieniem molekularnego podłoża wybranych chorób dysmielinizacyjnych. Efektem wspólnie prowadzonych badań jest 1 publikacja oraz 5 komunikatów zjazdowych.

Prof. Sandra Coecke (In-Vitro Methods Unit/ECVAM, Institute for Health and Consumer Protection, European Commission, Joint Research Centre, Ispra, Italy). Współpraca dotycząca wykorzystania ludzkich oligodendrocytów do przeprowadzania testów neurotoksykologicznych, w ramach projektu "Alternative methods for the assessment of acute and chronic neurotoxicity – application of cord blood-derived neural stem cell line". Wynikiem współpracy jest 6 komunikatów zjazdowych, a także 2 publikacje.

Prof. Santiago Rivera (Neurobiologie des Interactions Cellulaires et Neurophysiopathologie (NICN), UMR 6184, CNRS, Aix-Marseille University, Marseille, France). Współpraca mająca na celu zbadanie funkcji metaloproteinaz w procesach

neurogenezy i gliogenezy *in vitro* oraz *in vivo*. Do tej pory ukazała się 1 wspólna publikacja.

5.7. Udział w projektach badawczych:

Projekt badawczy własny Nr 0531/P2/93/04 pt; „Różnorodność fenotypowa a ekspresja genów białek mielinowych u mutantów królika”-[1993-1995]- **kierownik projektu**

Projekt międzynarodowy EC 22143-2004-06 F1ED ISP PL pt “Alternative methods for the assessment of acute and chronic neurotoxicity – application of cord blood-derived neural stem cell line” –[2004-2005]-wykonawca projektu

Projekt badawczy własny Nr 5A 177 29 MNiSW pt: „Badanie oddziaływań sygnałów zewnątrzkomórkowych i wewnątrzkomórkowych na proliferację i różnicowanie ludzkich neuralnych komórek macierzystych pochodzących z krwi pępowinowej”- [2005–2007]-wykonawca projektu

Projekt badawczy Nr N401 018 32/0296 MNiSW pt. „Oligogliogeneza neuralnych komórek macierzystych z krwi pępowinowej-wpływ czynników troficznych, neuroformogenów i oddziaływań międzykomórkowych w badaniach *ex vivo*”-[2007-2009]- **kierownik projektu**

Projekt badawczy własny NR 5978/B/P01/2010/38 pt. „Otrzymywanie indukowanych komórek pluripotencjalnych i zróżnicowanych w kierunku neuronów z populacji komórek macierzystych ludzkiej krwi pępowinowej oraz ich immobilizacja na mikromacierzach powierzchni biofunkcjonalnej”- [2010-2012]-wykonawca projektu

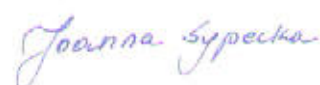
Projekt badawczy NR 0345/B/P01/2010/38 pt.” Wpływ mikrośrodowiska komórkowego na różnicowanie się i dojrzewanie komórek progenitorowych (NG2) oligodendrocytów”-[2010-2012]-**kierownik projektu**

Projekt badawczy OPUS NR 2011/01/B/NZ4/05728 NCN pt.: „Ocena ludzkich komórek somatycznych pochodzących z Galarety Whartona, przeszczepianych w postaci trójwymiarowych agregatów do tkanki nerwowej mózgu szczura: badanie mechanizmów ich przeżycia i funkcji w warunkach *ex vivo* i *in vivo*.”-[2012-2014] –**główny wykonawca projektu**

Projekt badawczy NR 6430/B/P01/2011/40 pt.„Domózgowe implanty galarety Whartona jako mało immunogenne źródło mezenchymalnych komórek macierzystych w eksperymentalnym uszkodzeniu mózgu u szczurów” –[2012-2014] – **główny wykonawca projektu**

Projekt badawczy 2012/05/B/NZ3/00436 pt. „Stymulacja endogennej neurogenezy jako nowa strategia terapeutyczna w modelu asfiksji okołoporodowej szczura”-[2013-2015]-**główny wykonawca projektu**

Projekt „Nowoczesne metody, leki i terapie w ochronie zdrowia i gospodarce Europy XXI wieku – interdyscyplinarne kształcenie w obszarze nauk biomedycznych na studiach II i III stopnia” –[2013-2015]-**koordynator merytoryczny projektu w IMDiK PAN (Partner 3 projektu)**



Dr Joanna Sypecka