

dr n. biol. Grażyna Pyka-Foćciak
Katedra Histologii, Wydział Lekarski
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum
ul. Kopernika 7
31-034 Kraków

Autoreferat

do Wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego

Wrzesień 2023

1. Imię i nazwisko.

Grażyna Pyka-Fościak

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

1996 – 2001: Uniwersytet Jagielloński, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, dyplom magistra w dziedzinie biologii. Temat pracy: „Tworzenie osłon jajowych latarniowców (Insecta, Hemiptera: Fulgoromorpha)”

2001 – 2006: Uniwersytet Jagielloński, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, dyplom doktora nauk biologicznych. Temat pracy: „Budowa i rozwój żeńskiej gonady żyworodnych i jajorodnych pokoleń mszycy, *Stomaphis quercus* (Hemiptera, Aphidinea, Lachnidae), załącznik nr 2

2003 – 2005: Uniwersytet Jagielloński, Studium Pedagogiczne, dyplom ukończenia studiów podyplomowych w zakresie kwalifikacji pedagogicznych do pracy nauczycielskiej w nauczaniu biologii, chemii i przyrody

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

2001 – 2005: Uniwersytet Jagielloński, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi; nauczyciel akademicki

2001 – 2006: Instytut Fizyki Jądrowej PAN, stażysta/specjalista/starszy specjalista naukowo-techniczny

2008 – 2012: Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Katedra Histologii; asystent

2012 – obecnie: Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Katedra Histologii; adiunkt

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.). Omówienie to winno dotyczyć merytorycznego ujęcia przedmiotowych osiągnięć, jak i w sposób precyzyjny określać indywidualny wkład w ich powstanie, w przypadku, gdy dane osiągnięcie jest dziełem współautorskim, z uwzględnieniem możliwości wskazywania dorobku z okresu całej kariery zawodowej.

4.1. Tytuł osiągnięcia:

Histologiczna i biomechaniczna ocena zmian zapalnych i neurodegeneracyjnych w mysim modelu stwardnienia rozsianego, EAE (experimental autoimmune encephalomyelitis)

Osiągnięcie naukowe udokumentowano cyklem czterech monotematycznych oryginalnych prac (choć zakres powyższych badań obejmuje także inne publikacje, w których jestem pierwszym i korespondującym autorem). Łączny współczynnik wpływu (**Impact Factor, IF**): **19.713**, łączna punktacja **MNiSW: 480 pkt.**

4.2. Spis publikacji do cyklu:

4.2.1. *Changes in spinal cord stiffness in the course of experimental autoimmune encephalomyelitis, a mouse model of multiple sclerosis.*

Grażyna Pyka-Foćciak, Joanna Zemła, Grzegorz J. Lis, Jan A. Litwin, Małgorzata Lekka. 2020; Archives of Biochemistry and Biophysics; 680:61.

IF: 4.013, MNiSW: 100, kwartyl Q2

Mój wkład: sformułowanie hipotezy badawczej, koncepcja pracy; przygotowanie wniosku o zgodę Komisji Bioetycznej; całościowe zaplanowanie i przeprowadzenie eksperymentu, w tym immunizacja myszy, codzienna ocena kliniczna stopnia porażenia i pomiar wagi myszy oraz pobieranie materiału do badań; wykonanie barwień histologicznych i immunohistochemicznych; przeprowadzenie analiz morfometrycznych, wykonanie obrazów mikroskopowych oraz ocena histologiczna i ich interpretacja; samodzielne przeprowadzenie pomiarów biofizycznych przy użyciu mikroskopu sił atomowych; interpretacja danych i analiza wyników z AFM; korelacja wyników histologicznych i biomechanicznych; przygotowanie i napisanie manuskryptu,

w tym przygotowanie wykresów, tabel, rysunków, zdjęć, diagramu, udzielenie odpowiedzi na recenzje manuskryptu; kierowanie projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy. Jestem współautorem korespondencyjnym niniejszej pracy.

4.2.2. Adhesion molecule profile and the effect of anti-VLA-4 mAb treatment in experimental autoimmune encephalomyelitis, a mouse model of multiple sclerosis.

Grażyna Pyka-Foćciak, Grzegorz J. Lis, Jan A. Litwin. 2022; International Journal of Molecular Sciences; 23:9. This article belongs to the Special Issue Inflammation in the CNS and PNS: From Molecular Basis to Therapy.

IF: 5.600, MNiSW: 140, kwartyl Q1

Mój wkład: sformułowanie hipotezy badawczej, koncepcja pracy; przygotowanie wniosku o zgodę Komisji Bioetycznej; całościowe zaplanowanie i przeprowadzenie eksperymentu, w tym immunizacja myszy, codzienna ocena kliniczna stopnia porażenia i pomiar wagi myszy, iniekcja leku, oraz pobieranie materiału do badań; wykonanie większości barwień histologicznych i immunohistochemicznych; przeprowadzenie analiz morfometrycznych, wykonanie obrazów mikroskopowych oraz ich ocena histologiczna i interpretacja; kierowanie projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy; przygotowanie i napisanie manuskryptu, w tym przygotowanie wykresów, zdjęć, diagramu, udzielenie odpowiedzi na recenzje manuskryptu. Jestem autorem korespondencyjnym niniejszej pracy.

4.2.3. Biomechanical changes in the liver tissue induced by a mouse model of multiple sclerosis (EAE) and the effect of anti-VLA-4 mAb treatment.

Grażyna Pyka-Foćciak, Joanna Zemła, Janusz Lekki, Bożena Wójcik, Grzegorz J. Lis, Jan A. Litwin, Małgorzata Lekka. 2022; Archives of Biochemistry and Biophysics; 728:109356.

IF: 3.900, MNiSW: 100, kwartyl Q1

Mój wkład: sformułowanie hipotezy badawczej, koncepcja pracy; przygotowanie wniosku o zgodę Komisji Bioetycznej; całościowe zaplanowanie i przeprowadzenie eksperymentu, w tym immunizacja myszy, codzienna ocena kliniczna stopnia porażenia i pomiar wagi myszy, iniekcja leku, oraz pobieranie materiału do badań; wykonanie

barwień histologicznych i immunohistochemicznych; przeprowadzenie analiz morfometrycznych, wykonanie obrazów mikroskopowych oraz ich ocena histologiczna i interpretacja; samodzielne przeprowadzenie pomiarów biofizycznych przy użyciu mikroskopu sił atomowych i reometru; interpretacja danych i analiza wyników z AFM i reometru; korelacja wyników histologicznych i biomechanicznych; kierowanie projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy; przygotowanie i napisanie manuskryptu, w tym przygotowanie tabel, wykresów, rysunków, zdjęć, udzielenie odpowiedzi na recenzje manuskryptu. Jestem autorem korespondencyjnym niniejszej pracy.

4.2.4. Changes in stiffness of the optic nerve and involvement of neurofilament light chains in the course of experimental autoimmune encephalomyelitis, an animal model of multiple sclerosis.

Grażyna Pyka-Fościak, Mateusz Fościak, Joanna Pabijan, Grzegorz J. Lis, Jan A. Litwin, Małgorzata Lekka. 2023; *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. 166796.

IF: 6.2, MNiSW: 140, kwartyl Q1

Mój wkład: sformułowanie hipotezy badawczej, koncepcja pracy; przygotowanie wniosku o zgodę Komisji Bioetycznej; całościowe zaplanowanie i przeprowadzenie eksperymentu, w tym immunizacja myszy, codzienna ocena kliniczna stopnia porażenia i pomiar wagi myszy oraz pobieranie materiału do badań; wykonanie barwień immunohistochemicznych; przeprowadzenie analiz morfometrycznych, wykonanie obrazów mikroskopowych oraz ich ocena histologiczna i interpretacja; współudział w wykonaniu testu immunoenzymatycznego Elisa; samodzielne przeprowadzenie pomiarów biofizycznych przy użyciu mikroskopu sił atomowych; interpretacja danych i analiza wyników z AFM; korelacja wyników histologicznych i biomechanicznych; przygotowanie i napisanie manuskryptu, w tym przygotowanie wykresów, tabel, rysunków, zdjęć, udzielenie odpowiedzi na recenzje manuskryptu; kierowanie projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy. Jestem autorem korespondencyjnym niniejszej pracy.

Kopie powyższych prac – **załącznik nr 7**

Oświadczenia współautorów o indywidualnym wkładzie pracy – załącznik nr 8

4.3. Omówienie celu naukowego, wyników i ewentualnego wykorzystania rezultatów prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

Przedstawiony cykl czterech prac dotyczących eksperymentalnego autoimmunizacyjnego zapalenia mózgu i rdzenia kręgowego (*experimental autoimmune encephalomyelitis*, EAE) zawiera opis oraz wyniki programu badań, który zaproponowałam i rozwinęłam w Katedrze Histologii UJ CM. Jednym z istotnych aspektów mojej działalności naukowej, który znacząco wpłynął na jej dynamikę i obecny kształt, było wprowadzenie do moich badań metod biofizycznych. Współpraca z Zakładem Badań Mikroukładów Biofizycznych Instytutu Fizyki Jądrowej PAN, prowadzonym przez prof. dr hab. Małgorzatę Lekką, umożliwiła mi zastosowanie zaawansowanych i nowatorskich biofizycznych technik badawczych (mikroskopii sił atomowych – AFM – i reometrii). Te techniki zostały połączone z tradycyjnymi metodami histologicznymi i histochemicznymi, a także z barwieniami immunohistochemicznymi i analizą immunoenzymatyczną ELISA. Zagadnienia objęte powyższym cyklem publikacji stanowią mój indywidualny wkład w rozwój nauki. Publikacje są przedstawiane zgodnie z kolejnością prowadzonych prac badawczych. Badania były finansowane z uzyskanej przeze mnie z dotacji statutowej UJ CM (projekty: K/ZDS/006248, N41/DBS/000564 i N41/DBS/000950). W cyklu prac przedstawionych jako osiągnięcie naukowe badano rdzenie kręgowo i nerwy wzrokowe myszy z EAE, gdyż podlegają one głównym zmianom patologicznym w przebiegu tej choroby, a także wątroby, z uwagi na możliwy wpływ leku stosowanego w terapii (jego działanie zostało przedstawione także w publikacjach niewchodzących w skład przedstawionego powyżej osiągnięcia naukowego – poz. 6, 7 bibliografii).

Chciałam także podkreślić, że zarówno część eksperymentalną i pomiarową mojej pracy badawczej wykonałam samodzielnie. W Jagiellońskim Centrum Rozwoju Leków (JCET) przeprowadziłam indukcję EAE, codziennie monitorowałam, oceniałam stan kliniczny i wagę ciała myszy podczas całego eksperymentu, podawałam iniekcyjnie lek, perfundowałam myszy oraz pobierałam narządy i krew. W Instytucie Fizyki Jądrowej PAN samodzielnie wykonałam biomechaniczne pomiary tkanek przy użyciu mikroskopu sił atomowych i reometru, natomiast w Katedrze Histologii UJ CM wykonałam barwienia

histologiczne i immunohistochemiczne oraz rejestrację obrazów mikroskopowych i ich analizę. Dodatkowo we wszystkich badaniach byłam twórczynią hipotezy badawczej, pomysłodawczynią eksperymentów i badań oraz kierowałam projektami naukowymi obejmującymi badania opisane w pracach włączonych do osiągnięcia naukowego.

Wprowadzenie

Eksperymentalne autoimmunizacyjne zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego (*experimental autoimmune encephalomyelitis*, EAE) jest najbardziej znanym i szeroko stosowanym doświadczalnym modelem zwierzęcym stwardnienia rozsianego (MS, *multiple sclerosis*), przewlekłej choroby zapalnej ośrodkowego układu nerwowego (OUN) charakteryzującej się demielinizacją prowadzącą do nieprawidłowego funkcjonowania mózgu, nerwów wzrokowych i rdzenia kręgowego [1]. Choroba ma najczęściej przebieg wielofazowy z okresami zaostrzeń (rzutów) i braku obserwowanej aktywności (remisji), tzw. postać rzutowo-nawracająca (ang. *relapsing-remitting MS*, RRMS). W późniejszych etapach schorzenia u większości chorych obserwuje się stopniową progresję objawów deficytu neurologicznego – przejście w postać wtórnie postępującą (ang. *secondary progressive MS*, SPMS). MS może także charakteryzować się stałym postępem choroby od początku jej trwania, tzw. postacią pierwotnie postępującą (ang. *primary progressive MS*, PPMS). Obecnie przyjmuje się, że w fazach choroby z okresami zaostrzeń dominuje proces zapalny, zaś w postaciach PPMS i SPMS dominuje proces neurodegeneracyjny [2]. Do najczęstszych objawów lub zespołów objawów stwardnienia rozsianego zalicza się zaburzenia ruchowe, czuciowe, mózdkowe (zaburzenia równowagi), zaburzenia widzenia, zaburzenia autonomiczne, zespoły bólowe oraz objawy psychiatryczne: zaburzenia poznawcze i zaburzenia nastroju. Proces zmian patologicznych zachodzi w różnych obszarach OUN (wielogniskowość, ang. *dissemination in space*, DIS) i w różnych okresach czasowych (wieloczasowość, ang. *dissemination in time*, DIT). Mechanizmy rozsianych zmian demielinizacyjnych w MS nie zostały w pełni poznane i do dziś nie wiadomo co jest czynnikiem spustowym choroby. Przyjmuje się, że jest to schorzenie autoimmunologiczne o wieloczynnikowym podłożu. Dostępna wiedza na temat mechanizmów demielinizacji na podłożu autoimmunologicznym pochodzi w znacznej mierze z badań na modelu EAE, a obserwacje doświadczalne w wielu wypadkach potwierdzono w badaniach pacjentów z MS. Model EAE uznaje się za najlepszy, zwierzęcy model MS, a etapy patologii EAE

imitują swym przebiegiem zaburzenia neurologiczne obserwowane u ludzi z MS. Dzięki temu model EAE umożliwia badanie patomechanizmów choroby oraz wstępne badania różnych sposobów leczenia MS. Szczególnie duże podobieństwo między MS i EAE obserwuje się na poziomie zmian histopatologicznych w OUN, dzięki czemu możliwe jest odniesienie wyników badań na zwierzętach do patogenezy MS. Do wywołania EAE stosuje się immunizację autoantygenami z OUN (np.; mielinową glikoproteiną oligodendrocytów, MOG, ang. *myelin oligodendrocyte glycoprotein*), które powodują odpowiedź autoimmunologiczną, a w rezultacie chorobę porażenną myszy. W przebiegu mysiego modelu EAE, MOG wywołuje odpowiedź zarówno komórkową, jak i humoralną, natomiast zastosowanie podczas immunizacji toksyny krztuśca (PTx, ang. *pertussis toxin*) powoduje przełamanie bariery krew-mózg (BBB, ang. *blood-brain barrier*) i infiltrację leukocytów do tkanki nerwowej, a w konsekwencji prowadzi do wytworzenia ognisk zapalnych i demielinizacji [3]. Proces indukcji EAE trwa 2 dni, natomiast pierwsze objawy kliniczne (faza początkowa, *onset*) pojawiają się już po kilku dniach. Cały eksperyment trwa około miesiąca, z wystąpieniem zaostrzenia choroby (faza szczytowa, *peak*) i etapem częściowego wycofania objawów klinicznych (faza chroniczna, *chronic/recovery*). Myszy z EAE są oceniane codziennie pod względem objawów klinicznych według skali od 0 do 3, gdzie 0 oznacza brak klinicznej choroby, 1 – bezwładny ogon, 2 – bezwładny ogon i osłabienie tylnych nóg, 3 – bezwładny ogon i całkowity bezwład tylnych nóg. Wraz z postępem nasilenia EAE następuje utrata masy ciała, osiągając spadek nawet około 20% sprzed początku choroby [3]. U ludzi diagnoza MS opiera się o koncepcję zmian demielinizacyjnych w substancji białej, oddzielonych od siebie w czasie i przestrzeni. W aktualnych kryteriach diagnostycznych McDonalda z 2017 roku zdefiniowano warunki, jakie muszą być spełnione do rozpoznania SM. Według tych kryteriów wystąpienie nowych zmian patologicznych w badaniu rezonansu magnetycznego (MR, ang. *magnetic resonance*) rozsianych w czasie (DIT) i przestrzeni (DIS) pozwalają przyspieszyć rozpoznanie MS u pacjentów z klinicznie izolowanym zespołem (ang. *clinically isolated syndrome*, CIS) i rozpoczęcie leczenia na wczesnym etapie choroby [4].

Jak dotąd nie udało się jednoznacznie ustalić przyczyny, a także swoistego dla schorzenia mechanizmu w postaci odpowiedzi immunologicznej oraz zmian neurozwyrodnieniowych. Według ściśle immunologicznej teorii tłumaczącej patogenezę MS, w inicjacji procesu zapalnego główną rolę odgrywają autoreaktywne limfocyty T,

komórki o charakterze regulatorowym oraz cytokiny i chemokiny prozapalne, które są mediatorami demielinizacji. Kluczową funkcję limfocytów T stanowi głównie przerwanie ciągłości bariery krew-mózg, co prowadzi do intensywnej infiltracji różnych komórek zapalnych do OUN, rozwoju stanu zapalnego i utraty oligodendrocytów odpowiedzialnych za tworzenie osłonek wokół aksonów. Warto też podkreślić, że dominującymi komórkami nacieku zapalnego są makrofagi, które biorą udział w trawieniu osłonki mielinowej, prowadzące do demielinizacji, a dalej glejozy (rozrostu astrogleju i bliznowacenia włókien nerwowych), uszkodzenia aksonów i ich utraty. Przerwanie ciągłości aksonów może wynikać zarówno z procesów zapalnych, jak i neurodegeneracyjnych. Uszkodzenie czy utrata aksonów wiąże się ze zmianami zanikowymi w OUN chorych, co prowadzi do zaburzeń neurologicznych oraz odpowiada za postęp niepełnosprawności [5].

Podczas choroby, komórki śródbłonna BBB wykazują wysoki poziom ekspresji receptorów dla różnych cytokin prozapalnych oraz cząsteczek adhezyjnych, które jeszcze bardziej wpływają na przełamanie BBB i przenikanie komórek zapalnych do OUN. W procesie uszkodzenia BBB biorą także udział metaloproteinazy (MMP), ułatwiając w ten sposób przejście autoreaktywnych limfocytów do OUN. Enzymy te przyczyniają się do degradacji zasadowego białka mieliny i aktywują niektóre prozapalne cytokiny, np. TNF- α [6]. Ważną cytokiną jest także osteopontyna uwalniana przez szereg aktywowanych makrofagów, limfocytów i innych leukocytów, która bierze udział w inicjowaniu odpowiedzi immunologicznej [7].

Procesy naprawy, czyli remielinizacji rozpoczynają się już we wczesnych etapach choroby, jednakże nie dochodzi do całkowitej odbudowy mieliny przez oligodendrocyty. Proces nieprawidłowej i niepełnej remielinizacji prowadzi w rezultacie do pojawiania się objawów neurologicznych, a sam przebieg choroby może być bardzo zróżnicowany w zakresie częstości rzutów i/lub szybkości narastania niewydolności neurologicznej [8].

Stosowane leczenie objawowe oraz leczenie modyfikujące przebieg choroby mogą spowolnić rozwój i zmniejszyć dolegliwości. Jednym ze sposobów leczenia MS jest blokowanie napływu antygenowo swoistych limfocytów T do OUN przez podanie przeciwciała monoklonalnego anti-VLA-4, natalizumabu (Fig.1). Badania nad mechanizmem naciekania leukocytów przez BBB ujawniły, że integryna $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4, ang. *very-large antigen 4*) jest krytyczną cząsteczką adhezyjną, która uczestniczy w migracji leukocytów podczas patogenezy EAE. VLA-4 wpływa na migrację komórek

odpornościowych poprzez oddziaływanie ze swoim ligandem, cząsteczką adhezji komórek śródbłonna 1 (VCAM-1, ang. *vascular cell adhesion molecule-1*) obecnym na śródbłonku objętym stanem zapalnym. Zablokowanie receptora VLA-4 utrudnia przechodzenie limfocytów i monocytów przez barierę krew–mózg do OUN (Fig. 1). Uzyskano znaczne złagodzenie objawów klinicznych myszy z EAE, a badania kliniczne u ludzi z zastosowaniem natalizumabu wykazały skuteczność działania terapeutycznego: leczenie wykazało redukcję ognisk zapalnych, mniejszą liczbę nawrotów choroby i spowolnienie postępu niepełnosprawności [9].

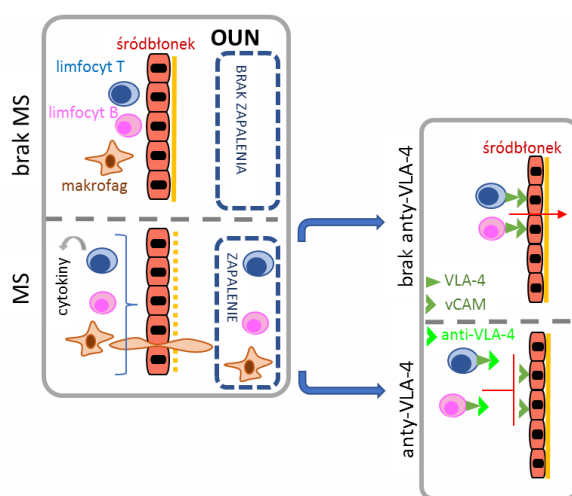


Fig. 1. Schemat działania anty-VLA-4 w przypadku MS. Zastosowanie leczenia anty-VLA-4 blokuje adhezję komórek stanu zapalnego do śródbłonna i zapobiega ich przenikaniu przez barierę krew-mózg.

Dzięki mysiemu modelowi EAE możliwe jest poznanie złożonych mechanizmów odpowiedzi immunologicznej, które pozwoli na lepsze zrozumienie patogenezy MS i przyczyni się do opracowania nowych, skutecznych metod leczenia tej choroby.

W przedstawionych w ramach osiągnięcia naukowego badaniach zostały zastosowane barwienia histologiczne, immunohistochemiczne, testy immunoenzymatyczne ELISA oraz analizy morfometryczne obrazów mikroskopowych. Własności biomechaniczne badanych próbek tkankowych oceniano przy użyciu mikroskopu sił atomowych oraz reometru rotacyjnego.

Właściwości biomechaniczne tkanki wpływają na ważne procesy biologiczne, w tym proliferację komórek, różnicowanie i ogólną homeostazę tkanek. Zmiany właściwości biomechanicznych tkanek mogą także promować podział, rozprzestrzenianie się i migrację komórek. Stosowane pomiary własności biomechanicznych tkanek są źródłem informacji na temat różnic strukturalnych pomiędzy obszarami zdrowymi i patologicznie zmienionymi, a w perspektywie mogą stać się czołową metodą diagnostyczną zarówno w badaniach *in vivo*, jak i *ex vivo*. Ponadto analiza wyników histologicznych w powiązaniu z parametrami biofizycznymi może pomóc w zrozumieniu mechanizmów patogenezы MS.

Działanie mikroskopu AFM polega na pomiarze oddziaływań występujących pomiędzy badaną próbką a sondą, składającą się z ostrza zamontowanego na sprężystej belce (Fig. 2A,B). Siły działające pomiędzy próbującą sondą AFM a badaną powierzchnią powodują wygięcie belki, a pomiar jest dokonywany z dokładnością rzędu pikoNewtonów. Ugięcie belki rejestrowane jest za pomocą lasera, którego wiązka światła skierowana jest na koniec belki i po odbiciu od niej pada na pozycyjnie czułą fotodiodę (Fig. 2A). Poruszanie i skanowanie próbki są realizowane przez skaner piezoelektryczny, który umożliwia precyzyjne przemieszczanie próbki podczas pomiaru. Na podstawie relacji pomiędzy przyłożoną siłą, a powstałym ugięciem badanej próbki jest wyznaczana wartość modułu elastyczności Young'a. Zmiany wielkości tego modułu niosą informację o przemianach zachodzących w strukturze kompleksu cytoszkieletu–błony komórkowej czy organizacji substancji pozakomórkowej i przedstawiają ewentualne zmiany w badanej tkance (Fig. 2C). Dokładna kontrola stosowanej siły oraz rozmiary próbującego ostrza umożliwiają precyzyjny i prawdziwie lokalny pomiar właściwości biomechanicznych, tj. sprężystości (sztywności) i adhezji. Dodatkową zaletą mikroskopu AFM jest możliwość pomiaru właściwości biomechanicznych żywych, nieutrwalonych próbek, tj. komórek czy tkanek. Pomiary prowadzone są w warunkach zbliżonych do fizjologicznych (w cieczy), z nanometrową rozdzielczością pozwalającą także na badanie bardzo małych struktur biologicznych, tj. białek czy łańcuchów DNA. Badania własności biomechanicznych przy użyciu mikroskopu AFM mają szerokie zastosowanie w przypadku komórek czy tkanek zmienionych chorobowo, np. w przebiegu cukrzycy, miażdżycy, chorób neurodegeneracyjnych, czy wielu typów nowotworów [10]. Mózgi pacjentów cierpiących na MS wykazują od 13% do 20,5% niższą sztywność [11,12]. W przypadku komórek nowotworowych postuluje się rolę ich elastyczności w procesie

metastazy [13]. Uważa się bowiem, że komórki nowotworowe, które w wyniku transformacji stają się miękkie i podatne na deformację, mają ułatwioną zdolność pokonywania różnego rodzaju barier mechanicznych napotykanym w tkankach podczas przerzutowania. Dodatkowo, proces nowotworzenia powoduje wzrost intensywności oddziaływań fizycznych komórek na skutek ich zwiększonej ruchliwości, przyspieszonego podziału i zmienionej adhezji [14]. Mikroskopia sił atomowych może również służyć do oceny zmian własności mechanicznych pojedynczych komórek w następstwie działania substancji chemicznych oraz leków [15].

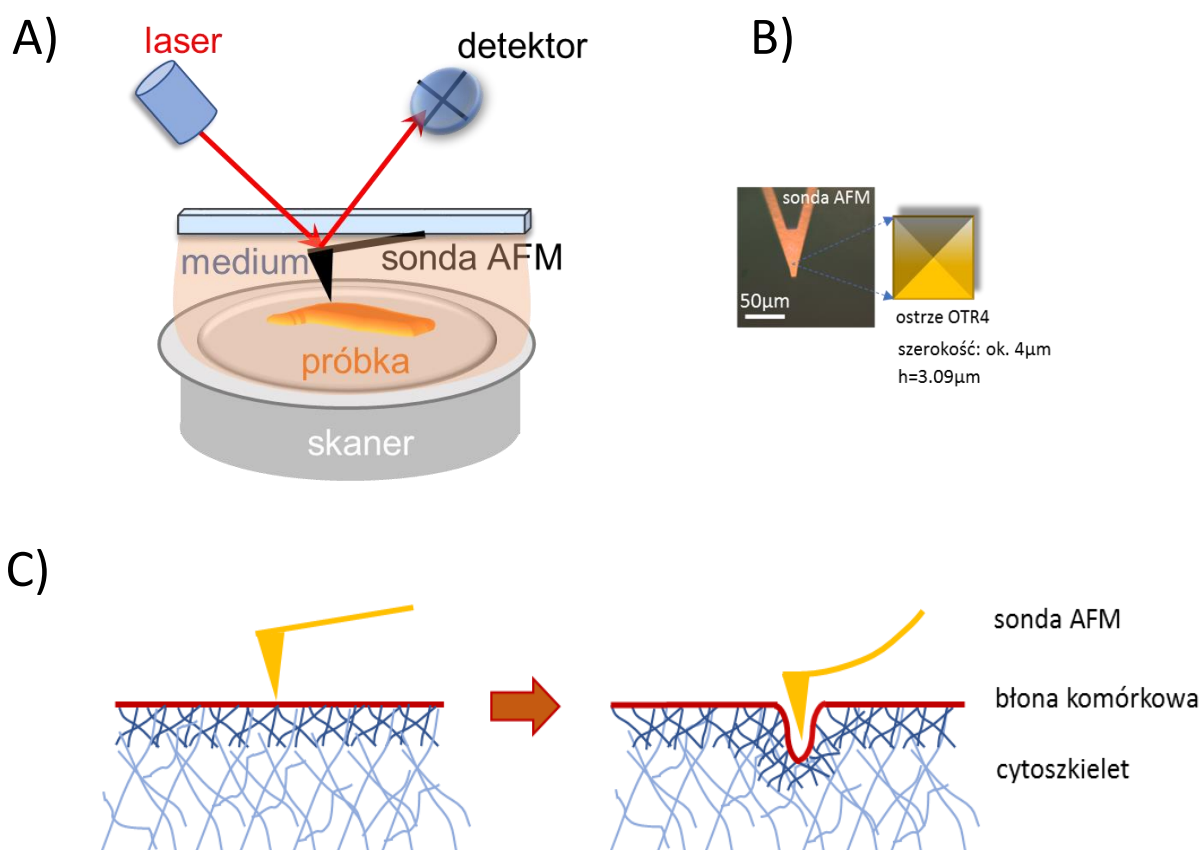


Fig. 2. A) Zasada działania mikroskopu AFM. B) Obraz sondy pomiarowej AFM w mikroskopie świetlnym oraz schematyczny rysunek ostrza próbującego (stosowanego w opisanych badaniach) zlokalizowanego na końcu sondy OTR4 (stała sprężystości: $k=0.02$ N/m). C) Schemat przedstawia zachowanie błony komórkowej i cytoszkieletu pod wpływem naciskającego ostrza sondy AFM.

W badaniach własności biomechanicznych próbek biologicznych wyróżnia się dwa główne podejścia eksperymentalne. W przypadku opisywanego powyżej zastosowania mikroskopu AFM pomiar jest przeprowadzany lokalnie, w skali mikro, co pozwala na

uzyskanie odpowiedzi mechanicznej każdego elementu strukturalnego próbki. Natomiast w przypadku badań z zastosowaniem reometru, siła powodująca odkształcenie jest przykładana do całej próbki, a uzyskiwana informacja jest wypadkową własności mechanicznych wszystkich składników strukturalnych badanej próbki. Zasada działania reometru rotacyjnego opiera się na ścinaniu badanej próbki w szczelinie pomiędzy dwoma powierzchniami, z których jedna wykonuje ruch obrotowy, a druga jest nieruchoma (Fig. 3). Natomiast wynik pomiaru umożliwia określenie zależności między prędkością ścinania i naprężeniem ścinającym, umożliwiając obliczenie modułu sprężystości G' oraz modułu stratności G'' . Zmiany patologiczne w komórkach i tkankach zmieniają ich właściwości sprężyste, a współczynnik stratności jest parametrem odróżniającym tkanki zdrowe od zmienionych patologicznie.

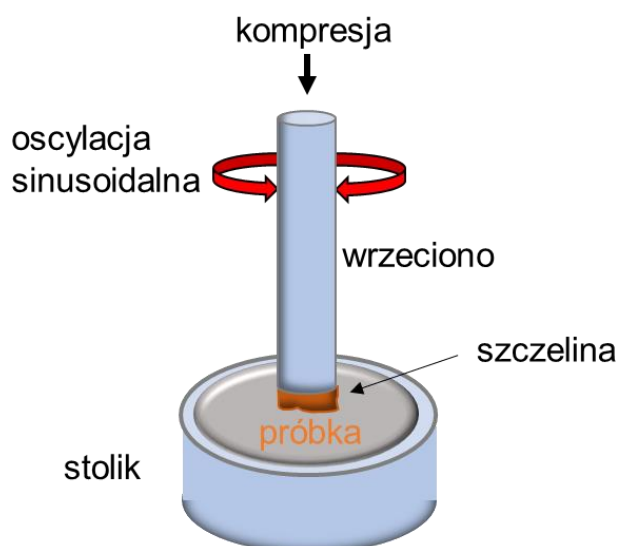


Fig. 3. Zasada działania reometru rotacyjnego.

Celem i zadaniem badań, przedstawionych jako osiągnięcie naukowe, w skład, którego wchodzi cykl czterech prac było:

- przeprowadzenie indukcji choroby w mysim modelu EAE,
- zastosowanie technik histologicznych, histochemicznych i immunohistochemicznych, a także testu ELISA w połączeniu z biomechanicznymi pomiarami rdzeni kręgowych, nerwów wzrokowych i wątroby w badaniach w mysim modelu EAE,
- ocena zmian histologicznych i biomechanicznych w kolejnych fazach EAE,

- zbadanie deficytów neurologicznych, tj. utraty aksonów, demielinizacji oraz stopnia reakcji zapalnej na różnych etapach EAE oraz korelacja wymienionych parametrów histologicznych z właściwościami biofizycznymi rdzeni kręgowych i nerwów wzrokowych ocenianymi przy użyciu mikroskopu sił atomowych (AFM),
- analiza zmian ekspresji lamininy i neurofilamentów lekkich jako parametrów wpływających odpowiednio na sztywność rdzeni kręgowych czy nerwów wzrokowych podczas EAE,
- zbadanie wpływu leczenia przeciwciałem monoklonalnym anti-VLA-4 na poziom infiltracji leukocytów, ekspresję cząsteczek adhezyjnych i stopień niepełnosprawności myszy na różnych etapach EAE,
- zastosowanie metod biomechanicznych (AFM i reometru) oraz oceny histologicznej do badania zmian sztywności i infiltracji komórek zapalnych w wątrobie myszy z EAE podczas leczenia anti-VLA-4.

W **pierwszej publikacji cyklu** oceniano stopień zmian stanu zapalnego i neurodegeneracji (demyelinizacji i uszkodzenia aksonów) myszy z EAE jako głównych cech histologicznych EAE/MS, a zmiany te zostały porównane ze zmianami sztywności rdzeni kręgowych. W mysim modelu stwardnienia rozsianego, progresja objawów klinicznych pozwala wyróżnić trzy kolejne fazy choroby: początek (*onset*), szczyt (*peak*) i fazę przewlekłą (*chronic*). Wyróżniona faza przedwstępna (*preonset*) myszy immunizowanych nie wykazała objawów klinicznych ani zmian histologicznych, ale stanowiła dodatkową kontrolę, obok kontroli *mock* (myszy bez immunizacji) i *naïve* (myszy zdrowe). Dodatkowym parametrem potwierdzenia faz EAE była zastosowana kontrola spadku masy ciała myszy, który był silnie skorelowany z nasileniem choroby.

W pierwszym etapie badań, zastosowane barwienia histologiczne i analizy morfometryczne rdzeni kręgowych myszy z EAE wykazały wielogniskowe zmiany w obrębie istoty białej rdzenia kręgowego, związane ze zwiększoną akumulacją komórek odpornościowych, demielinizacją oraz uszkodzeniem aksonów w rdzeniu kręgowym, silnie skorelowanymi z nasileniem objawów klinicznych [16]. U myszy z EAE, wraz z postępowaniem choroby nastąpił spadek masy ciała zwierząt, a objawy kliniczne wykazały dysfunkcje ruchowe i koordynacyjne. Wyniki morfometryczne ujawniły zmiany zależne

od fazy choroby. Podobnie jak w przypadku wcześniejszych badań [17], głównymi komórkami stanu zapalnego były leukocyty, w tym limfocyty T, makrofagi, a także komórki mikrogleju. Ilościowa ocena standardowych parametrów patologicznych EAE: nacieku zapalnego, demielinizacji i uszkodzenia aksonów wykazała najmniejszą powierzchnię zmian w fazie początkowej i jej znaczny wzrost w fazie szczytowej. W fazie przewlekłej nastąpił spadek zapalenia, podczas gdy stopień demielinizacji utrzymał się na tym samym poziomie, co może wskazywać na bardzo słaby proces remielinizacji (jeśli w ogóle taki proces zachodzi w tej fazie, bowiem obserwuje się w niej dalszy wzrost utraty aksonów). Konsekwencją trwającego procesu zapalnego jest degradacja osłonek mielinowych, co prowadzi do utraty aksonów. U pacjentów z MS remielinizacja jest szczególnie związana z wczesnymi stadiami choroby i ostrymi fazami, ale może również wystąpić w późniejszych i przewlekłych stadiach choroby. Zwykle remielinizacja nie koreluje z objawami klinicznymi, wiekiem wystąpienia choroby ani płcią [18].

W drugiej części badań, zmiany własności elastycznych rdzeni kręgowych oceniano również w trzech punktach czasowych odpowiadających kolejnym fazom choroby. Taka analiza nie została do tej pory przeprowadzona, a technika AFM nie miała zastosowania w badaniu tkanki nerwowej w przebiegu EAE. Większość badań pojedynczych neuronów z zastosowaniem AFM dotyczyła zwykle komórek utrwalonych [19]. Dlatego też badania przy użyciu AFM umożliwiły ilościową ocenę zmian własności biomechanicznych nieutrwalonej tkanki nerwowej i dzięki temu poszerzyły spojrzenie na proces patogenezy i neurodegeneracji w przebiegu EAE/MS.

Zmiany sztywności tkanek są związane z zachodzącymi w nich procesami patologicznymi. Sztywność tkanek przypisywana jest głównie właściwościom macierzy zewnątrzkomórkowej, chociaż komórki w znacznym stopniu przyczyniają się do zmian sztywności tkanki, głównie poprzez zmiany organizacji cytoszkieletu i błony komórkowej [20]. W tkance nerwowej macierz pozakomórkowa występuje w małej ilości, ograniczając się do blaszek podstawnych komórek Schwanna i naczyń krwionośnych, ale na właściwości biomechaniczne dodatkowo wpływa obecność osłonek mielinowych, nieobecnych w innych tkankach. Sztywność mikrośrodowiska ma wpływ na zachowanie komórek nerwowych: wzrost aksonów jest szybszy, a ich rozgałęzienia bardziej rozległe na miękkich podłożach [21,22]. Dlatego też wydaje się, że sztywność mikrośrodowiska odgrywa istotną rolę w procesach naprawy neuronów. Zmiany

elastyczności mózgu lub rdzenia kręgowego były badane podczas powstawania blizn glejowych [23] oraz w chorobach neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera [24], stwardnienie zanikowe boczne [25] i stwardnienie rozsiane [12], w których obserwowano zmniejszenie sztywności tkanki nerwowej. Zatem procesy zapalne i neurodegeneracyjne przyczyniają się do zmian sztywności tkanki nerwowej i zasadnym było zbadanie parametrów biomechanicznych wpływających na mechanizmy patogenezy EAE i przebieg tej choroby.

Zbadaliśmy zmiany sztywności rdzenia kręgowego w przebiegu EAE i porównaliśmy je ze zmianami głównych parametrów histopatologicznych EAE: stanu zapalnego, demielinizacji i uszkodzenia aksonów w celu wyjaśnienia czynników wpływających na właściwości biomechaniczne tkanki nerwowej. Zmiany histopatologiczne i sztywności tkanki zaobserwowano tylko w obrębie istoty białej, dlatego też dalsze analizy dotyczyły tylko tego obszaru. Sztywność rdzenia kręgowego wzrosła w początkowej fazie, utrzymała się na tym samym poziomie w fazie szczytowej choroby (*peak*) i tej zmianie towarzyszył wzrost nacieku zapalnego i ekspresji lamininy (składnika blaszek podstawnych, wpływających na sztywność), sugerując, że za efekt ten może być odpowiedzialna większa gęstość komórek zapalnych i nagromadzenie białek macierzy pozakomórkowej, co zostało wykazane też w innych badaniach [26]. Wykazano, że w przebiegu MS/EAE dochodzi do nacieku leukocytów w okolice blaszek podstawnych otaczających naczynia włosowate, co prawdopodobnie przyczynia się do przerwania bariery krew-mózg, a utrata niektórych izoform lamininy w blaszkach podstawnych naczyń sprzyja infiltracji leukocytów [27]. Z kolei w fazie przewlekłej EAE sztywność istoty białej zmniejsza się ponownie. Spadek zagęszczenia komórek stanu zapalnego wpływa na obniżenie sztywności rdzeni kręgowych, choć nadal postępuje demielinizacja i uszkodzenie aksonów, sugerując dalsze zmiany neurodegeneracyjne, pomimo spadku nacieczenia zapalnego. Sztywność tkanki nerwowej jest dodatnio skorelowana z zawartością mieliny [28], co potwierdziły nasze badania, gdyż istota biała zbudowana jest głównie z zmielinizowanych włókien nerwowych w przeciwieństwie do istoty szarej, która zawiera znacznie mniej mieliny.

Stwardnienie rozsiane powoduje także zmiany zanikowe (atrofię) w obrębie OUN [29]. Analizowaliśmy także takie zmiany w obrębie rdzeni kręgowych myszy z EAE, stosując morfometryczną ocenę pola powierzchni przekrojów poprzecznych rdzeni kręgowych myszy z EAE i kontrolnych. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w

całkowitej powierzchni obszarów istoty szarej i białej rdzeni kręgowych, zatem myszy z EAE nie rozwinęły zmian zanikowych (prawdopodobnie było to spowodowane zbyt krótkim, miesięcznym czasem eksperymentu). Oznacza to, że zmiany histopatologiczne i biomechaniczne obserwowane w tym i dalszych badaniach opierających się na takich samych punktach czasowych nie mogły być związane z atrofią rdzenia kręgowego.

Wyniki pierwszej publikacji cyklu wykazały, że zmianę sztywności OUN można uznać za wczesną oznakę EAE, po której następują pierwsze objawy kliniczne. Wyniki naszych badań wskazują, że stan zapalny, demielinizacja i uszkodzenie aksonów związane są ze zmianami sztywności tkanki nerwowej rdzenia kręgowego. Zmianom komórkowym i neurodegeneracyjnym towarzyszyły także zmiany zawartości lamininy, która może być traktowana jako biomarker sztywności i bezpośrednio wpływa na zmiany biomechaniczne tkanki nerwowej. Wyniki naszych badań dostarczyły zatem dowodów, że nie tylko aspekty biologiczne, ale również właściwości biomechaniczne komórek i tkanek, w szczególności zmiany sztywności, odgrywają ważną rolę w rozpadzie bariery krew-mózg i mają poważne konsekwencje dla prawidłowego funkcjonowania OUN.

W drugiej publikacji cyklu kontynuowano immunohistochemiczne badania rdzeni kręgowych, skupiono się na ocenie i roli oddziaływania cząsteczek adhezyjnych regulujących migrację leukocytów przez barierę krew-mózg [30]. W czasie trwania eksperymentu, myszom podano dootrzewnowo natalizumab, przeciwciało monoklonalne o działaniu immunosupresyjnym przeciwko cząsteczce adhezyjnej, integrynie $\alpha 4$ (VLA-4), stosowane w terapii stwardnienia rozsianego. Natalizumab blokuje interakcję między cząsteczkami adhezyjnymi VLA-4 i VCAM-1, a w efekcie hamuje przenikanie limfocytów T przez barierę krew-mózg do OUN (Fig. 1).

U myszy z EAE zastosowanie przeciwciał przeciwko VLA-4 hamowało ostrą fazę choroby i jej objawy kliniczne, w porównaniu z grupą kontrolną zwierząt z EAE, która otrzymała przeciwciało anti-IgG, a w trakcie progresji EAE obniżyło objawy kliniczne we wszystkich fazach choroby, opóźniło początkową fazę [6,7,30,31], zahamowało migrację leukocytów do obszaru zapalnego i zmniejszyło stan zapalny rdzenia kręgowego [6,7,30].

Przeprowadzone analizy morfometryczne rdzeni kręgowych myszy z EAE wykazały także, że mechanizm terapeutyczny leczenia anti-VLA-4 obejmuje złożony wpływ na

różne cząsteczki adhezyjne ekspozowane przez naciekające komórki i śródbłonek naczyń w kolejnych fazach EAE [30]. Badania dotyczyły ekspresji par oddziałujących na siebie głównych cząsteczek adhezyjnych VCAM-1/VLA-4, ale także pary ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*) i LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen 1*). Ekspresja pary ICAM-1/LFA-1 została porównana także z ekspresją cząsteczki adhezyjnej PECAM-1 (*platelet-endothelial cell adhesion molecule 1*). Interakcje VLA-4/VCAM-1, LFA-1/ICAM-1 i PECAM-1/PECAM-1 odgrywają ważną rolę w adhezji i migracji leukocytów przez barierę krew-mózg [32,33], a obniżona ekspresja cząsteczek adhezyjnych w komórkach śródbłona mózgu może prowadzić do zmniejszenia nacieku zapalnego i zahamowania powstawania nowych zmian patologicznych w EAE [34]. Cząsteczka PECAM-1 bierze udział nie tylko w przezśródbłonkowej migracji leukocytów, ale także stabilizuje przepuszczalność bariery, reguluje integralność naczyń i transport komórek odpornościowych [35].

U nieleczonych myszy chorych na EAE (kontrola EAE), dla oddziaływań ICAM-1/LFA-1 i PECAM-1 pojawił się dominujący wzór ekspresji czasowej: wzrost w fazie początkowej, maksimum w fazie szczytowej i spadek w fazie przewlekłej. Zależność ta była skorelowana z nasileniem objawów klinicznych i poziomem stanu zapalnego w poszczególnych fazach EAE. Para VCAM-1/VLA-1 nie wykazywała spadku ekspresji w fazie przewlekłej – zamiast tego zaobserwowano wzrost ekspresji VCAM-1 lub brak zmian w porównaniu z fazą szczytową ekspresji VLA-1. Utrzymywanie wysokiego poziomu ekspresji niektórych cząsteczek adhezyjnych w fazie przewlekłej EAE jest nową obserwacją wskazującą na zróżnicowany udział cząsteczek adhezyjnych w przebiegu choroby. Ponadto zwiększenie poziomu VLA-4 w limfocytach T jest kluczowe dla ich migracji do OUN [36] oraz uważa się, że limfocyty przylegają do aktywowanego śródbłona poprzez VLA-4 i LFA-1, ale ich późniejsza migracja wydaje się być regulowana głównie przez ICAM-1 i częściowo przez PECAM-1. W MS zaobserwowano zwiększoną ekspresję PECAM-1, która może odzwierciedlać mechanizmy naprawy naczyń mające na celu przywrócenie integralności bariery krew-mózg i hamowanie migracji komórek T [35]. Wyraźny wzrost ekspresji PECAM-1 obserwowany w fazie szczytowej EAE i słaby spadek jej poziomu w fazie przewlekłej wydają się potwierdzać istotną rolę tej cząsteczki w rozwoju choroby.

Nowatorskim odkryciem przedstawionych badań jest to, że leczenie anty-VLA-4 hamuje ekspresję nie tylko VLA-4, ale także innych badanych cząsteczek adhezyjnych.

Zgodnie z oczekiwaniami, hamowanie to w przypadku VLA-4 było najsilniejsze i niezależne od fazy. Co ciekawe, w przypadku ICAM-1, VCAM-1 i PECAM-1 hamujący efekt leczenia anty-VLA-4 był opóźniony i występował w szczytowej i przewlekłej fazie EAE (ICAM-1 i VCAM-1) lub nawet tylko w fazie przewlekłej (PECAM-1). Omawiane cząsteczki adhezyjne są przynajmniej częściowo związane z komórkami śródbłonna, stąd wydaje się, że śródbłonek reaguje z pewnym opóźnieniem na blokujące działanie terapii anty-VLA-4.

Wyniki tego badania uzasadniają przypuszczenie, że mechanizm terapeutyczny leczenia anty-VLA-4 obejmuje złożony wpływ na różnorodne cząsteczki adhezyjne ekspozowane przez naciekające komórki i śródbłonek naczyń oraz skutecznie hamuje objawy kliniczne EAE we wszystkich fazach choroby, opóźnia początkową fazę choroby, hamuje migrację leukocytów do obszaru zapalnego i zmniejsza stan zapalny rdzenia kręgowego.

W trzeciej publikacji cyklu przedstawiono dalsze badania modelu EAE, które obejmują analizy zmian histologicznych, biomechanicznych i bioreologicznych wątroby myszy w kolejnych etapach EAE. Jest to kontynuacja badań opisanych w drugiej publikacji cyklu.

Niepożądanym skutkiem leczenia natalizumabem jest uszkodzenie wątroby [37], a ryzyko toksycznego wpływu na wątrobę utrzymuje się przez cały okres terapii, nawet po podaniu pierwszej dawki lub po wznowieniu leczenia. Próbkę wątroby pobrane od myszy z EAE w trzech kolejnych fazach choroby wykazały zmiany objawiające się naciekami zapalnymi i podwyższonym poziomem cytokiny prozapalnej IL-1 β . Badania te zostały wykonane po raz pierwszy i wykazały, że procesom zapalnym w OUN towarzyszy zapalenie wątroby, skorelowane z nasileniem objawów klinicznych, z najwyższym stopniem nacieczenia zapalnego w szczytowej fazie choroby. Leczenie natalizumabem nie wpłynęło na zmniejszenie stanu zapalnego wątroby, choć przyczyniło się do obniżenia poziomu IL-1 β . Dalsze badania histologiczne zmian w obrębie wątroby objęły analizy morfometryczne ewentualnego zwłóknienia poprzez wyznaczenie zmian poziomu kolagenu. Zwłóknienie wątroby objawiające się podwyższoną zawartością kolagenu wystąpiło jedynie w ostatniej, przewlekłej fazie EAE, a leczenie anty-VLA-4 nie wykazało wpływu na zawartość kolagenu. Zarówno analizy poziomu stanu zapalnego,

jak i zwłóknienie zostały uznane jako dalsze parametry zmian w wątrobie i zostały skorelowane z właściwościami biomechanicznymi.

Sztywność tkanki wątroby można uznać za parametr biofizyczny odzwierciedlający ewentualne zmiany patologiczne [38]. Zmiany sztywności są głównie wynikiem zwłóknienia, przekrwienia i zapalenia wątroby [33], takie zmiany obserwowano w różnych typach przewlekłych chorób wątroby, takich jak wirusowe zapalenie wątroby typu B [39] i C [40], alkoholowe uszkodzenie wątroby [41], stłuszczenie metaboliczne [42] i marskość wątroby [43]. W przedstawionych tu badaniach biomechanicznych zastosowano dwie metody do oceny ewentualnych zmian w wątrobie: mikroskopię AFM oceniającą lokalne zmiany (sztywności) i reometrię do pomiaru zmian w całej badanej próbce (zmiany lepkości). Pomiarzy AFM wykazały, że sztywność wątroby w początkowej i przewlekłej fazie EAE była wyższa niż u myszy kontrolnych, nieimmunizowanych (sztywność próbek kontrolnych nie zmieniła się w czasie trwania eksperymentu). Oba parametry biomechaniczne: sztywność i lepkość próbek wątroby myszy z EAE wzrosły w początkowej fazie choroby i osiągnęły najwyższe wartości w fazie przewlekłej, w której pojawiło się także zwłóknienie wątroby, kluczowy czynnik zwiększający jej sztywność, proporcjonalny do zawartości kolagenu. Co istotne, wzrost sztywności wątroby poprzedza fibrogenezę [44]. Zatem przewlekły etap EAE należy uznać za początkową fazę zwłóknienia wątroby, objawiającą się także najwyższym wzrostem parametrów biomechanicznych tkanki. Należy zwrócić uwagę na fakt, iż oba parametry, zarówno reologiczne, jak i sztywność, wykazywały taką samą zależność czasową z etapami EAE, potwierdzając jednolitą odpowiedź biomechaniczną tkanki wątroby na patologię związaną z EAE.

Terapia anty-VLA-4 spowodowała obniżenie objawów klinicznych EAE, opóźnienie fazy początkowej choroby, a także obniżyła ekspresję prozapalnej IL-1 β , jednakże w zależności od etapu EAE, w różny sposób wpłynęła na własności biomechaniczne. Natomiast leczenie anty-VLA-4 nie wpłynęło na zmianę sztywności wątroby od fazy początkowej do fazy przewlekłej, a w porównaniu z kontrolnymi myszami z EAE, którym podawano IgG, wartość modułu Younga obniżyła się dopiero w fazie przewlekłej. W przypadku pomiarów reometrycznych, leczenie anty-VLA-4 wpłynęło na wzrost obu parametrów lepkości: zarówno modułu sprężystości G' , jak i modułu stratności G'' wraz z nasileniem EAE. W próbkach wątroby pobranych od myszy z grupy kontrolnej, którym podano IgG zamiast natalizumabu, spadek modułu

sprężystości G' obserwowano w fazie początkowej i przewlekłej, a w przypadku modułu stratności G'' – spadek wystąpił tylko w fazie początkowej.

Trzecia publikacja cyklu dostarczyła zatem dowodów, że procesom zapalnym tkanki nerwowej w przebiegu EAE towarzyszy zapalenie wątroby, objawiające się przez nacieki leukocytarne i podwyższony poziom ekspresji IL-1 β w wątrobie. Co więcej, procesy zapalne wątroby były czasowo skorelowane ze zmianami zapalnymi w OUN i nasileniem objawów klinicznych EAE, a leczenie anty-VLA-4 wpłynęło na zmiany zapalne tylko w obrębie tkanki nerwowej. Natomiast badania właściwości biomechanicznych wątroby wykazały zmiany nanomechaniczne i bioreologiczne, szczególnie w porównaniu do próbek zdrowych, kontrolnych, a fazę początkową należy uznać również za początek tych zmian. Wsunęliśmy zatem hipotezę, że zaobserwowane zmiany wpływające na właściwości biomechaniczne wątroby mogą wynikać z interakcji między stanem zapalnym a zwłóknieniem, a także między własnościami komórek wątroby i składników substancji pozakomórkowej.

W czwartej publikacji cyklu poddano analizie próbki nerwów wzrokowych, które zarówno w SM, jak i EAE wykazują przewlekły, postępujący proces zapalny prowadzący do demielinizacji. Podobnie jak we wcześniejszych badaniach, analizie poddano próbki w kolejnych etapach EAE (od przedwstępnego do przewlekłego). Dostępne dane wskazują, że zwierzęta z EAE wykazywały deficyty wzroku już tydzień po immunizacji, a ubytki te wzrastały w ciągu następnych 3-4 tygodni, po czym nastąpił powrót do zdrowia, co odpowiadało fazom klinicznym choroby [45].

Nerw wzrokowy jest grubą, zwartą wiązką silnie zmielinizowanych włókien nerwowych, którym towarzyszą liczne astrocyty [46]. W urazach OUN astrocyty mogą ulec aktywacji i utworzyć bliznę glijową [47], regulują również demielinizację aksonów i ich subpopulacje, a neurotoksyczne astrocyty A1 odgrywają znaczącą rolę w zapaleniu nerwu wzrokowego [48]. W chorobach neurodegeneracyjnych nerwy wzrokowe są najbardziej dotknięte stanem zapalnym i ostrym uszkodzeniem aksonów w porównaniu z innymi częściami drogi wzrokowej [49]. W pierwszej części badań, klasyczne barwienia histologiczne nerwów wzrokowych myszy z EAE wykazały stan zapalny, demielinizację oraz uszkodzenie i obrzęk aksonów. O ile pierwsze dwa parametry wykazały największy stopień zmian w fazie szczytowej EAE, to degeneracja aksonów była najsilniejsza w fazie przewlekłej, w której zaobserwowano również najwyższą liczbę astrocytów. Nasze

badania wykazały zatem, że podczas EAE intensywność procesu zapalnego i zmiany neurodegeneracyjne (demielinizacja, uszkodzenie aksonów, glejoza) postępują współzależnie, w zależności od etapu choroby. Wyniki pokazują zależny od czasu wzrost trzech parametrów: stanu zapalnego (od fazy przedwstępnej), demielinizacji i utraty aksonów (oba od fazy początkowej) [50].

W opisywanych badaniach skupiliśmy się również na neurofilamentach, głównym składniku cytoszkieletu włókien nerwowych, uważanym za potencjalny biomarker uszkodzenia aksonów w MS i EAE, przydatny do monitorowania postępu choroby i terapii modyfikującej przebieg choroby [51], a także parametr odzwierciedlający zmiany sztywności tkanki nerwowej. Co więcej, ostatnie doniesienia wskazują, że wyższe stężenia lekkich łańcuchów neurofilamentów (NEFL) w surowicy są również związane z większym upośledzeniem integralności bariery krew-mózg [52]. Neurofilamenty o lekkich łańcuchach występują powszechnie we wszystkich zdrowych neuronach, ale po degeneracji neuronów połączonej z uszkodzeniem aksonów i synaps są powoli uwalniane do płynów biologicznych, takich jak osocze czy płyn mózgowo-rdzeniowy. Zmniejszona ekspresja NEFL w degenerujących i uszkodzonych aksonach jest dobrze skorelowana z wzrostem ich stężenia w płynach biologicznych [53].

W niniejszym badaniu zbadaliśmy po raz pierwszy sztywność nerwu wzrokowego oraz zawartość NEFL w próbkach nerwu wzrokowego i surowicy krwi, korzystając odpowiednio z mikroskopii sił atomowych (AFM), immunohistochemii i testu ELISA. Pomiar te porównano z ilościową oceną standardowych parametrów patologicznych SM/EAE, takich jak naciek zapalny, demielinizacja i uszkodzenie aksonów, obserwowanych w obrazach histologicznych próbek nerwów wzrokowych. Ponieważ nerw wzrokowy myszy wykazuje specyficzną morfologię charakteryzującą się obfitością astrocytów towarzyszących włóknom nerwowym, zbadano również ekspresję kwaśnego białka włóknistego gleju (GFAP, ang. *glial fibrillary acidic protein*).

Wyniki badania potwierdziły degradację neurofilamentów podczas procesów demielinizacji i utraty aksonów, ponieważ poziom NEFL w tkance nerwu wzrokowego obniżył się, a jego poziom w surowicy wzrósł w początkowej i szczytowej fazie choroby, potwierdzając „wyciek” NEFL z uszkodzonych aksonów do płynów ustrojowych. Jednak poziom NEFL nie wykazywał związku z utratą aksonów w fazie przewlekłej – wzrastał w tkance nerwu wzrokowego, a zmniejszał się w surowicy. Może to sugerować regenerację aksonów, chociaż związany z tym parametr histopatologiczny (utrata aksonów) nie

wykazał poprawy. Wręcz przeciwnie, największe wartości osiągnął w fazie przewlekłej EAE. Chociaż możliwa jest regeneracja uszkodzonego nerwu wzrokowego [54], rozbieżność tę można również wytłumaczyć kompensacyjnym tworzeniem się nowych neurofilamentów w przeżywających aksonach. Podsumowując, poziomy NEFL w tkankach, a zwłaszcza w surowicy krwi, są wczesnymi wskaźnikami EAE, ale w dalszych fazach choroby nie są związane z rozwijającą się patologią.

Spadek sztywności nerwu wzrokowego obserwowany we wszystkich fazach EAE, w porównaniu z próbkami nerwu wzrokowego uzyskanymi od myszy kontrolnych i naiwnych, zasadniczo odpowiada parametrom histopatologicznym choroby i wynika przede wszystkim z procesów związanych z demielinizacją i utratą aksonów. W nerwie wzrokowym wartości modułu Younga i czasowy wzorzec sztywności zmieniają się w kolejnych fazach EAE: wzrost od fazy przedwczesnej do początkowej, stabilizacja między fazą początkową a szczytową i znaczny spadek w fazie przewlekłej. Można to wytłumaczyć dużą zawartością nerwu wzrokowego wzmagającą efekt demielinizacji i utraty aksonów. Ponadto nerw wzrokowy myszy ma specyficzne cechy. Zamiast typowej dla innych gatunków ssaków tkanki łącznej w obrębie nerwu, zmielinizowanym włóknom nerwu wzrokowego towarzyszą warstwy wydłużonych astrocytów [46], które z pewnością przyczyniają się do zmian sztywności nerwu wzrokowego. Ponadto astrocyty mogą rekrutować komórki odpornościowe, wydzielać czynniki cytotoksyczne oraz hamować remielinizację i regenerację aksonów [47]. Co więcej, rozkład sztywności silnie koreluje także z obszarami jąder komórkowych, gęstością komórek, czy też orientacją aksonów [55]. Różnie zorientowane aksony zawierające równoległe wiązki neurofilamentów wpływają na sztywność w różnych obszarach tkanki nerwowej. Dodatkowo wykazano, iż usztywnienie tkanki nerwowej jest dodatnio skorelowane z zawartością mieliny [56]. Zmiany związane z mieliną bezpośrednio wpływają na sztywność i elastyczność tkanki, co z kolei może indukować zmiany w obrębie macierzy pozakomórkowej i infiltrację komórek odpornościowych [28].

Czwarta publikacja cyklu dostarczyła zatem dowodów na prognostyczne znaczenie wzrostu poziomu NEFL w surowicy jako wczesnego wskaźnika EAE. Obniżony poziom NEFL w tkance nerwu wzrokowego i podwyższone jego stężenie w surowicy można uznać za wczesne markery choroby. Zmiany sztywności nerwu wzrokowego w kolejnych fazach EAE wynikają z przebiegu procesów patologicznych, głównie demielinizacji i uszkodzeń aksonów związanych z degradacją neurofilamentów, które wydają się być

głównymi czynnikami zmniejszającymi odporność biomechaniczną włókien nerwowych nerwu wzrokowego.

Najważniejsze wyniki i osiągnięcia powyższych badań:

- podobnie jak w MS, badania na modelu EAE wykazały czasowe zmiany procesów zapalnych i neurodegeneracyjnych tj. demielinizacji, uszkodzenia aksonów, glejozy, a procesy te występują współzależnie, w zależności od fazy choroby,
- w kolejnych fazach EAE, tkanka nerwowa wykazuje zmiany sztywności wynikające z czasowego przebiegu procesów patologicznych,
- zmianę sztywności OUN można uznać za wczesną oznakę EAE,
- zmiany sztywności odgrywają ważną rolę w dezintegracji bariery krew-mózg,
- na zmiany sztywności tkanek w EAE wpływa zarówno ilość i rodzaj komórek, jak i elementy substancji pozakomórkowej,
- podwyższone stężenie NEFL w surowicy można uznać za wczesny biomarker choroby,
- tkankowy poziom NEFL może być parametrem odzwierciedlającym zmiany sztywności tkanki nerwu wzrokowego,
- zmiany wpływające na właściwości biomechaniczne wątroby wynikają z interakcji między stanem zapalnym a zwłóknieniem, a także między własnościami komórek wątroby i składników substancji pozakomórkowej,
- w przebiegu EAE procesom zapalnym OUN towarzyszy zapalenie wątroby, a fazę przewlekłą EAE można uznać za początkowy etap zwłóknienia wątroby,
- terapia anti-VLA-4 skutecznie wpływa na objawy kliniczne EAE i opóźnia fazę początkową EAE oraz reguluje ekspresję cząsteczek adhezyjnych komórek stanu zapalnego i śródbłonna naczyń,
- EAE jest dobrym modelem przydatnym do badania czasowych procesów i patomechanizmów odgrywających znaczącą rolę w patogenezie MS.

4.4. Podsumowanie dorobku naukowo-badawczego

Mój dorobek naukowy obejmuje w sumie **31 prac** pełnotekstowych o sumarycznym IF równym 65.981 (łącznie z pracami stanowiącymi osiągnięcie naukowe) i sumarycznej punktacji MNiSW równej 1391 pkt. (29 prac oryginalnych, 1 praca popularno-naukowa, 1 praca kazuistyczna, w tym 7 prac przed doktoratem, 24 po doktoracie).

Wg danych Web of Science **indeks Hirscha** wynosi **12**, a liczba cytowań 387 (dane z dn. 05.09.2023). Szczegółowy wykaz opublikowanych prac naukowych wraz analizą bibliometryczną osiągnięć naukowo-badawczych przedstawiono w **załączniku nr 6**.

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. Przebieg pracy naukowo-badawczej przed uzyskaniem stopnia doktora

Swoją pracę naukową rozpoczęłam w 2001 roku na kierunku biologia Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi, w Zakładzie Zoologii Systematycznej i Zoogeografii (obecnie Zakład Biologii Rozwoju i Morfologii Bezkręgowców) Uniwersytetu Jagiellońskiego, uzyskując tytuł magistra na podstawie pracy „Tworzenie osłon jajowych latarniowców (Insecta, Hemiptera: Fulgoromorpha)” wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Teresy Szklarzewicz. Praca przedstawia złożony proces różnicowania komórek płciowych i tworzenie osłonek jajowych w procesie oogenezy. Wyniki pracy magisterskiej były prezentowane w czasie Ogólnopolskiej Konferencji Embriologicznej (Wrocław, 2002) oraz Ogólnopolskiej Konferencji Mikroskopii Elektronowej (Poznań, 2002), a także zostały opublikowane w *Folia Biologica (Kraków)* [*Ultrastructural studies on the formation of egg envelopes in fulgoromorphans (Insecta, Hemiptera, Fulgoromorpha: Dictyopharidae) (2003), 51(3-4):171-9*].

Po zdanych egzaminach, zostałam przyjęta na Środowiskowe Studia Doktoranckie Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi. Swoją pracę naukową kontynuowałam w Zakładzie Zoologii Systematycznej i Zoogeografii Uniwersytetu Jagiellońskiego. W ramach studiów doktoranckich, pod dalszą opieką promotorską prof. dr hab. Teresy

Szklarzewicz, przygotowałam rozprawę doktorską dotyczącą biologii rozwoju mszycy, *Stomaphis quercus*. Praca doktorska pt. „Budowa i rozwój żeńskiej gonady żyworodnych i jajorodnych pokoleń mszycy, *Stomaphis quercus* (Hemiptera, Aphidinea, Lachnidae)” zawiera kompletną wiedzę na temat rozwoju ciekawego gatunku mszycy, wykazującego szereg przemian pokoleń w ciągu jednego roku. W ramach badań do pracy doktorskiej przeprowadziłam analizy histochemiczne i histologiczne z wykorzystaniem mikroskopii świetlnej i elektronowej transmisyjnej dotyczące struktury jajnika oraz procesu oogenezy mszycy, obejmujących w ciągu jednego roku zarówno pokolenia żyworodne, jak i jajorodne, ze szczególnym uwzględnieniem dywersyfikacji nabłonka folikularnego. Zwróciłam także uwagę na obecność i rolę mikroorganizmów endosymbiotycznych zlokalizowanych w obrębie jajników oraz ich przekazywanie na następne pokolenia zarodków. Wyniki mojej pracy doktorskiej były kilkakrotnie prezentowane w czasie konferencji ogólnopolskich (Symposium Mikroskopii Elektronowej w Poznaniu, 2004; XXVI Konferencji Embriologicznej w Łodzi, 2004; XXVII Konferencji Embriologicznej w Zakopanem, 2006), a także opublikowane: w *The International Journal of Developmental Biology* [*Germ cell cluster formation and ovariole structure in viviparous and oviparous generations of the aphid Stomaphis quercus* (2008), 52(2-3):259-65] oraz w *Acta biologica Cracoviensia. Series botanica* [*Organization and development of the gonads in viviparous and oviparous generations of Stomaphis quercus* (Insecta, Hemiptera, Aphidinea: Lachnidae) (2004) 46 :45-45], [*Structure of ovaries of Stomaphis quercus* (Insecta, Hemiptera, Aphidinea : Lachnidae) and *Phylloxera* sp (Insecta, Hemiptera, Aphidinea : Phylloxeridae) (2006), 48:70-70].

Oprócz własnych badań, brałam również czynny udział w badaniach dotyczących filogenezy pierwotnych czerwców z rodziny Steingeliidae. Badania te były prowadzone we współpracy z Uniwersytetem Rolniczym w Krakowie. Wyniki były referowane w czasie obrad VII Europejskiego Kongresu Entomologii (Grecja, Thessaloniki, 2002) i X Międzynarodowego Symposium Badań Czerwców (Turcja, Adana) oraz zostały opublikowane w *Arthropod Structure and Development* [*Structure of the ovary in Steingelia* (Sternorrhyncha: Coccinea), and its phylogenetic implications (2003), 32(2-3):247-56] i w *Acta biologica Cracoviensia. Series botanica* [*Morphology and ultrastructure of the ovary of Steingelia gorodetskia* (Insecta, Hemiptera, Coccinea: Steingeliidae) (2004), 46:28-28].

Ze względu na nieprzyznanie stypendium doktoranckiego, rozpoczęcie dalszych studiów wiązało się z podjęciem pracy zarobkowej. Zostałam zatrudniona na stanowisku stażysty, następnie specjalisty, a później starszego specjalisty naukowo-technicznego w Instytucie Fizyki Jądrowej PAN. W ramach tej pracy poszerzyłam swoje horyzonty naukowo-techniczne, ucząc się nowych metod (hodowli komórkowych, barwień immunohistologicznych, przygotowywania próbek do pomiarów biofizycznych oraz różnych metod pomiarowych), a także współuczestniczyłam w realizacji wielu projektów obejmujących dziedziny na pograniczu biologii, medycyny, biofizyki i nanotechnologii. Szczególnie cennym doświadczeniem była dla mnie praca przy użyciu techniki mikroskopu sił atomowych (AFM). Aktywnie uczestniczyłam w badaniach dotyczących zmian elastyczności żywych komórek (erytrocytów i komórek nowotworowych), jak również charakterystyki wybranych typów wiązań, występujących w oddziaływaniach pomiędzy pojedynczymi białkami. Dużym osiągnięciem był mój aktywny udział (pomiar AFM, przygotowanie próbek krwi, analiza i interpretacja wyników) w projekcie „Własności reologiczne erytrocytów a ryzyko choroby sercowo-naczyniowej” we współpracy z Collegium Medicum UJ (Wydział Lekarski, Katedra Chorób Wewnętrznych i Gerontologii, Klinika Chorób Wewnętrznych i Geriatrii). Cykl prac przedstawia różne aspekty własności biofizycznych erytrocytów w grupach pacjentów z różnymi czynnikami ryzyka choroby sercowo-naczyniowej. Zostały one opublikowane w: *Biorheology [Erythrocyte stiffness probed using atomic force microscope (2005), 42(4):307-17]*; *Clinical Hemorheology and Microcirculation [Erythrocyte stiffness in diabetes mellitus studied with atomic force microscope (2006), 35(1-2):273-6]* oraz *[Rheological properties of erythrocytes in patients with high risk of cardiovascular disease (2008), 39(1-4):213-9]*. Dodatkowo, wyniki powyższych badań (poster) zostały osobiście zaprezentowane przeze mnie na XIII Europejskiej Konferencji Towarzystwa Hemoreologii Klinicznej (Siena, Włochy, 2005).

Technikę AFM wykorzystałam także do pomiarów siły wiązań adhezyjnych pomiędzy parą ligand-receptor w ich naturalnym środowisku. Wyniki tych badań zaowocowały trzema pracami w: *Acta Physica Polonica A [Study of adhesion interaction using atomic force microscopy (2004), 05(5):501-510]*; *European Biophysics Journal [Probing molecular interaction between concanavalin A and mannose ligands by means of SFM (2004), 33(7):644-50]* oraz *Journal of Physics: Condensed Matter [Binding activity of patterned concanavalin A studied by atomic force microscopy (2005), 17(18):1447-*

S1458], a także zostały zaprezentowane na konferencjach ogólnopolskich i międzynarodowych.

Swoje doświadczenie naukowo-techniczne zgłębiałam podczas odbywania miesięcznego stażu (2005) w Szwajcarii (Ecole Polytechnique Federale de Lausanne), podczas którego pracowałam w grupie badań biofizycznych i biomedycznych (Laboratoire de Physique de la Matière Complexe), **załącznik nr 5**. W ramach powierzonego mi zadania, testowałam mikroskop sił atomowych i doskonaliłam umiejętności pomiarowe badając oddziaływania fibronektyna-przeciwciała. Efektem tej współpracy jest publikacja w *Beilstein Journal of Nanotechnology [Probing fibronectin-antibody interactions using AFM force spectroscopy and lateral force microscopy, (2018), 15(6)1164-75]*. Możliwości zastosowania AFM w badaniach biologicznych i medycznych przedstawiłam w pracy popularno-naukowej w czasopiśmie *Wszechświat [Scanningowy Mikroskop Sił (SFM) i jego zastosowanie w badaniach biologicznych (2003), 104(4-6), 106-108]*.

Oprócz badań związanych z wykorzystaniem AFM, uczestniczyłam także w realizacji innych projektów naukowych, **załącznik nr 5**. Brałam udział w badaniach układu wiązki pojedynczych protonów przy użyciu akceleratora van de Graaffa i w eksperymentach z naświetlaniem komórek w ramach projektu CELLION, finansowanego w ramach 6. Programu Ramowego Unii Europejskiej: Sieć Badawczo–Treningowa (Marie Curie Research and Training Network, MC RTN); koordynatorem projektu był dr hab. Janusz Lekki. W ramach projektu (2004-2008) zatytułowanego *Studies on cellular response to targeted single ions using nanotechnology* prowadziłam hodowle komórkowe i przygotowywałam wzory białkowe (lektyn) na powierzchniach wykorzystywanych do hodowli komórkowych. Tematyka badań dotyczyła efektów radiobiologicznych spowodowanych naświetleniem precyzyjnie zlokalizowaną i bardzo dobrze kontrolowaną ilościowo wiązką pojedynczych jonów. Obiektem tych badań były pojedyncze komórki z hodowli komórkowych.

W ramach projektu *NANODERM – Quality of a skin as a barrier to ultra-fine particles* (2003–2007), 5 Program Ramowy UE, (koordynator Prof. T. Butz, University Leipzig) przygotowywałam skrawki parafinowe z próbek skóry w Katedrze Patomorfologii UJ CM. Swoje umiejętności poszerzyłam przez tygodniowy staż w ośrodku naukowym GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung GmbH (Darmstadt, Niemcy) oraz uczestniczyłam w tygodniowej wizycie naukowej w Lipsku

(Faculty of Physics and Earth Sciences, University Leipzig), **załącznik nr 5**. Głównym celem projektu było zbadanie możliwości przenikania nanocząsteczek tlenku tytanu, stanowiących powszechny składnik wielu kosmetyków, przez zewnętrzną warstwę ochronną skóry, warstwę rogową naskórka (*stratum corneum*).

Za działalność naukową prowadzoną w czasie studiów doktoranckich, zarówno na Wydziale BiNoZ UJ, jak i w IFJ PAN, otrzymałam dwa prestiżowe stypendia: stypendium dla doktorantów z Małopolskiego Funduszu im. St. Pigoń (2002–2003) i stypendium dla doktorantów UJ z Funduszu im. Stanisława Estreichera (2004–2005). Były one dla mnie dużym wyróżnieniem, stanowiącym dalszą motywację do pracy badawczej, szczególnie dotyczącej różnorodnej tematyki.

5.2. Przebieg pracy naukowo-badawczej po uzyskaniu stopnia doktora

5.2.1. Badania myszy chorujących na zwierzęcy model stwardnienia rozsianego – EAE (*experimental autoimmune encephalomyelitis*, eksperymentalne autoimmunologiczne zapalenie mózgu i rdzenia, EAE) – histopatologia zmian w obrębie tkanki nerwowej.

Oprócz prac stanowiących osiągnięcie naukowe będące podstawą do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego (omówione w części 4 autoreferatu), do grupy tej należy zaliczyć również prace z moich pozostałych badań dotyczące modelu EAE. We wszystkich pracach na ten temat jestem pierwszym i korespondującym autorem.

Moja pierwsza praca podejmująca zagadnienia modelu EAE pozwoliła mi opanować technicznie indukcję choroby u myszy, wyodrębnić jej fazy, wykazać udział komórek stanu zapalnego oraz oszacować utratę czy też przeżywalność komórek nerwowych. Praca została opublikowana w *Folia Histochemica et Cytobiologica [Immunohistochemical analysis of spinal cord components in mouse model of experimental autoimmune encephalomyelitis (2018), 31(12):2752]*. Podjęłam wówczas współpracę z uznanym w skali kraju ośrodkiem klinicznym (Uniwersytet Łódzki, Katedra i Klinika Neurologii), który oprócz leczenia stwardnienia rozsianego u pacjentów, prowadzi zaawansowane badania wykorzystujące myszy model EAE. Współpraca z Profesorem Mariuszem Stasiołkiem szczególnie pomogła mi w realizacji eksperymentu i zdobyciu niezbędnego doświadczenia. Wyniki badań wykazały zależną od fazy choroby dynamikę komórek zaangażowanych w patogenezę i przebieg EAE.

Zastosowana ocena zmian histopatologicznych pozwoliła wykazać uszkodzenie aksonów i śmierć neuronów podczas rozwoju i progresji choroby. Badane parametry były skorelowane z trzema kolejnymi fazami EAE: początkową, szczytową i przewlekłą, które charakteryzują różne objawy neurologiczne. W omawianej pracy wykazałam, że we wczesnych etapach choroby przeważają komórki stanu zapalnego. Badania te pokazały po raz pierwszy, że stan zapalny poprzedza śmierć oligodendrocytów i utratę komórek nerwowych. Jest to istotne odkrycie, ponieważ przypuszcza się również, że zmiany zapalne w OUN mogą pojawiać się wtórnie, w odpowiedzi na pierwotny proces utraty oligodendrocytów. Ważne zagadnienie tej pracy stanowiła też analiza makrofagów/komórek mikrogleju, jako komórek dominujących w przewlekłej fazie choroby, prawdopodobnie z powodu zmiany ich fenotypu z prozapalnego na przeciwzapalny.

Kolejnym etapem mojej działalności naukowej były dalsze badania mysiego modelu EAE dotyczące odpowiedzi na leczenie natalizumabem, przeciwciałem monoklonalnym przeciwko $\alpha 4\beta 1$ -integrynie (anti-VLA-4 mAb), stosowanym w leczeniu rzutowo-remisyjnej postaci MS. Natalizumab miał przebieg modyfikujący postęp kliniczny EAE, opóźnił wystąpienie początkowej fazy choroby EAE, ale także wykazał zróżnicowany wpływ na ekspresję metaloproteinaz macierzy (MMP) oraz ich inhibitorów tkankowych (TIMP), odgrywających znaczącą rolę w patogenezie MS/EAE. MMP uczestniczą w degradacji macierzy pozakomórkowej, w tym blaszek podstawnych naczyń, prowadząc do uszkodzenia bariery krew-mózg, tym samym ułatwiają transmigrację komórek odpornościowych do ośrodkowego układu nerwowego oraz biorą również udział w niszczeniu osłonek mielinowych, co prowadzi do utraty aksonów i neuronów. Leczenie natalizumabem znacząco zmniejszyło ekspresję dwóch głównych metaloproteinaz, MMP-2 i MMP-9, ale także zwiększyło ekspresję TIMP (TIMP-1 i TIMP-2) w szczytowej i przewlekłej fazie choroby. Efektowi temu towarzyszyło zahamowanie degradacji lamininy w blaszkach podstawnych naczyń oraz zmniejszenie nacieku zapalnego. Wyniki badań wykazały, że oprócz dobrze znanej aktywności antyintegrynowej, przeciwdziałającej transmigracji komórek odpornościowych do ośrodkowego układu nerwowego, natalizumab wzmacnia to działanie poprzez wpływ na ekspresję MMP i ich inhibitorów, prowadząc do ochrony integralności bariery krew-mózg. Efekty badań zostały opublikowane w *Journal of Physiology and Pharmacology*

[Effect of natalizumab treatment on metalloproteinases and their inhibitors in a mouse model of multiple sclerosis (2020), 71(2): 265-273].

Do prac badawczych dotyczących zastosowania natalizumabu w leczeniu SM/EAE należy zaliczyć także badania, które były kontynuacją prac zawartych w manuskryptach przedstawionych do osiągnięcia (punkt 4.2.2 i 4.2.3). Badania te były kontynuowane i poszerzone o analizy ekspresji osteopontyny (OPN) i jej interakcji z VLA-4, odgrywającej ważną rolę w patogenezie EAE/MS. VLA-4 ulega ekspresji w różnych leukocytach, a OPN oraz inne cząsteczki adhezyjne (VCAM-1 i fibronektyna) są jego ligandami. Przeciwdziałanie powstawaniu i/lub utrzymywaniu takiego szkodliwego układu adhezyjnego komórek promujących odpowiedź zapalną, charakterystycznego dla MS/EAE, powinno być korzystne dla pacjentów cierpiących na przewlekłe choroby zapalne. W tym kontekście zbadaliśmy ekspresję OPN i porównaliśmy ją z gęstością komórek zapalnych, oligodendrocytów oraz z ekspresją IL-17A w kolejnych fazach EAE. Te badania wykazały, że leczenie anti-VLA-4 nie tylko hamuje zależną od VLA-4 transmigrację komórek odpornościowych do OUN, ale także obniża poziom OPN i IL-17A i co więcej, hamuje utratę oligodendrocytów. To ostatnie odkrycie pokazuje inny efekt leczenia anti-VLA-4. Mechanizm nie jest w pełni poznany i może obejmować hamowanie sygnałów proapoptotycznych i/lub wpływ inhibitorów na aktywowane makrofagi/mikroglej, które uczestniczą w eliminacji oligodendrocytów. Zatem wyniki badań wykazały, że interakcja VLA-4 i OPN stanowi ważny mechanizm regulacji stanu zapalnego, a zatem redukcja ekspresji OPN i IL-17 w leukocytach indukowana przez anti-VLA-4 może mieć znaczenie kliniczne w leczeniu MS/EAE. Wyniki tych badań zostały przedstawione w *Folia Neuropathologica [Osteopontin expression and the effect of anti-VLA-4 mAb treatment in experimental autoimmune encephalomyelitis, a mouse model of multiple sclerosis (2023), 61 (2): 129-137]*.

Ostatnia praca dotycząca modelu EAE podsumowuje przebieg zmian histopatologicznych, wykorzystując różne metody barwień histologicznych i immunohistochemicznych, co pozwala na ocenę zmian w obrębie tkanki nerwowej podczas kolejnych faz choroby. Ze względu na ograniczoną dostępność próbek tkanki nerwowej chorych na MS, model EAE jest często stosowany w badaniach mechanizmu patogenezy MS. Szczególnie istotne są badania postępu choroby, które pozwalają ocenić stan zapalny, demielinizację i uszkodzenie aksonów w OUN. Ten rodzaj analizy histopatologicznej jest przydatny do monitorowania przebiegu EAE [6,7,30,50].

Badania wykazały, że wszystkie analizowane parametry histopatologiczne zmieniają się w początkowej fazie choroby i rosną równolegle z jej postępem. Napływ limfocytów T powoduje zmiany zapalne, które indukują demielinizację i uszkodzenie aksonów w rdzeniu kręgowym. Chociaż intensywność stanu zapalnego zmniejsza się w fazie przewlekłej EAE, procesy neurodegeneracyjne indukowane stanem zapalnym: demielinizacja i uszkodzenie aksonów trwają nadal. Wyniki badań zostały zaprezentowane w *Journal of Physiology and Pharmacology [Histopathological parameters of the spinal cord in different phases of EAE, a mouse model of multiple sclerosis, examined by classical stainings combined with immunohistochemistry, 2023]* – publikacja zaakceptowana w czasopiśmie.

Wyniki swoich badań związanych z modelem EAE zaprezentowałam podczas seminariów i wyjazdów konferencyjnych. Podczas Środowiskowego Seminarium Biofizyki w Nanoskali i Medycynie (06.06.2018), wygłosiłam obszerny wykład dotyczący zarówno schorzenia jakim jest MS, mysiego modelu EAE, jak również zaprezentowałam wyniki moich badań w referacie pt.: „*Badania własności elastycznych rdzeni kręgowych w mysim modelu stwardnienia rozsianego, EAE*” organizowanym przez Instytut Fizyki Centrum NANOSAM WFAiIS UJ i IFJ PAN. Ważniejsze konferencje, w których uczestniczyłam to: International Conference on AFM for Life Sciences and Nanomedicine, AFM Biomed Conference Kraków (04 – 08.09.2017), gdzie przedstawiłam poster *The spinal cord elasticity in EAE model assessed by atomic force microscopy* oraz na konferencji: AFM BioMed Marseille (20 – 22.07.2020, online edition), Atomic Force Microscopy in Life Sciences and Medicine.

5.2.2. Badania składu płytek miażdżycowych i wpływu leków na ich rozmiar i stabilizację.

Od początku pracy w Katedrze Histologii UJ CM uczestniczyłam w jej projektach badawczych, podczas których nawiązałam współpracę z Katedrą Farmakologii UJ CM. Badania, w których brałam udział, dotyczyły aterogenezy i zostały wykonane na zmodyfikowanych genetycznie myszach z brakiem ekspresji genów apolipoproteiny E oraz receptora dla lipoprotein o niskiej gęstości (apoE/LDLR-double knockout). Efektem tych badań jest pięć publikacji. Pierwsza wykazała, że nebiwolol podawany myszom zmniejszył wielkość blaszek miażdżycowych i została opublikowana w *Journal of Physiology and Pharmacology [The effect of nebiwolol on atherogenesis in*

apoE- knockout mice. (2009), 60(4):163-165]. Dalsze badania, finansowane z uzyskanej przeze mnie dotacji statutowej UJ CM (2012–2014, projekt: K/ZDS/002851), dotyczyły histologicznej i immunohistochemicznej oceny składników macierzy międzykomórkowej blaszek miażdżycowych oraz ich przebudowy z udziałem metaloproteinaz. W grupach zwierząt, którym podano nebivolol, zaobserwowano zmniejszenie zawartości kolagenu, makrofagów, limfocytów, obniżenie aktywności metaloproteinaz oraz zwiększenie zawartości komórek mięśniowych gładkich w płytkach miażdżycowych. Te badania wykazały i potwierdziły pozytywny wpływ zastosowanego leku na zmniejszenie blaszki miażdżycowej oraz zwiększenie jej stabilizacji (co zmniejsza ryzyko pęknięcia i następnych powikłań zakrzepowych). Wyniki badań zostały opublikowane w *Journal of Physiology and Pharmacology [Effect of nebivolol treatment on atherosclerotic plaque components in apoE-knockout mice. (2013) 64(6): 745-750]*. Podobnie, badania wpływu kolejnych leków AVE 0991, doksycykliny i perindoprilu wykazały ich pozytywny wpływ na zmniejszenie blaszki miażdżycowej i jej stabilizację. Efektem wymienionych badań są trzy manuskrypty opublikowane w *Journal of Physiology and Pharmacology [AVE 0991 - angiotensin-(1-7) receptor agonist, inhibits atherogenesis in apoE-knockout mice (2010), 61(2):181-183]*, *[The effect of doxycycline on atherogenesis in apoE-knockout mice (2011), 62(2) 247-250]*, *[Angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist ameliorates progress of atherosclerosis in apoE-knockout mice (2012), 63(1):77-85]*.

5.2.3. Histopatologia układu sercowo-naczyniowego.

Kolejne badania były prowadzone we współpracy z Katedrą i Kliniką Chirurgii Serca, Naczyń i Transplantologii UJ CM i dotyczyły zagadnień z zakresu układu naczyniowego. Pierwsze analizy dotyczyły zachowania śródbłonna i wazodylatacji tętnicy promieniowej pod wpływem czynników farmakologicznych stosowanych do jej predylatacji u chorych poddawanych operacji pomostowania aortalno-wieńcowego. W pierwszej fazie badań porównaliśmy efekt działania milrinonu i papaweryny [*Journal of Physiology and Pharmacology, Vasodilatory effect and endothelial integrity in papaverine- and milrine-treated human radial arteries. (2013), 64:41-45*]. Wykazano korzystniejsze działanie papaweryny (1 mg/ml) w stosunku do milrinonu (0.4 mg/ml), zarówno w zakresie zachowania integralności śródbłonna, jak i efektu wazorelaksacyjnego. W drugiej fazie badań zostały porównane efekty wpływu różnych

stężenia papaweryny: zastosowana w niższym stężeniu (0.5 mg/ml w stosunku do 2 mg/ml) wykazała zapobieganie skurczowi naczyń krwionośnych [*Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery, Vasodilatory efficacy and impact of papaverine on endothelium in radial artery predilatation for CABG surgery: in search for optimal concentration (2018), 33(6), 553-558*].

Dalsza współpraca z Katedrą i Kliniką Chirurgii Serca, Naczyń i Transplantologii UJ CM dotyczy mojego uczestnictwa w realizacji projektu *Ocena histopatologiczna zmian naciekowych w opłucnej u pacjentów po przebytych zakażeniu SARS-CoV2* (projekt NCN, kierownik dr hab. Janusz Konstanty-Kalandyk). Uczestniczę w analizie histologicznej próbek z opłucnej ściennej i płucnej pobranych od pacjentów poddawanych operacji kardiologicznej, którzy w okresie 1-6 miesięcy przed operacją przeszli zakażenie SARS-CoV2. Badanie ukierunkowane są na wyjaśnienie patogenetycznych zmian w pogrubionej opłucnej dotyczą poszukiwania zmian histologicznych charakterystycznych dla procesów zapalnych w SARS-CoV2 i zostaną skorelowane z innymi wynikami, m.in. tomografią komputerową klatki piersiowej. W przygotowaniu jest praca naukowa dotycząca opisanego tematu.

5.2.4. Badania morfologiczne i metodologiczne.

W Katedrze Histologii uczestniczyłam także w badaniach, w których wykazano przydatność przeciwciała monoklonalnego LN-5 do znakowania ludzkich sebcytów od początku ich różnicowania, zarówno w świeżo przygotowanych, jak i archiwalnych próbkach tkanek zatapianych rutynowo w parafinie [*Folia Histochemica et Cytobiologica, LN-5 antibody against human macrophages cross-reacts with routinely processed human sebaceous glands (2012);50:319-321*].

We współpracy ze Specjalistycznym Centrum Diagnostyczno-Zabiegowym *Medicina* współprowadziłam badania morfologicznej i immunohistochemicznej analizy przypadku rzadko spotykanego guza (hamartoma) w nietypowej lokalizacji jamy nosowej [*Cases Journal, Respiratory epithelial adenomatoid hamartoma of the anterior nasal septum a rare localisation of an unusual tumour in a child: a case report. (2009), 2:8151*].

5.2.5. Badania adhezji i elastyczności komórek oraz właściwości biomechaniczne i mikroreologiczne komórek, tkanek i narządów.

Stałą współpracę nawiązaną z IFJ PAN stanowi nie tylko obszar badań związanych z moją tematyką badawczą, ale także współuczestniczę w projektach na pograniczu medycyny i biofizyki, efektem których są opublikowane prace naukowe.

Uczestniczę w badaniach prowadzonych we współpracy z IFJ PAN i Kliniką Pulmunologii UJ CM przy realizacji projektu *Badanie własności nanomechanicznych ściany oskrzeli w remodelingu dróg oddechowych* (2018–2023, projekt NCN Preludium, kierownik dr Tomasz Stachura). Wstępne pomiary, które wykonaliśmy na wycinkach ściany oskrzeli chorych na astmę oskrzelową, przewlekłą obturacyjną chorobę płuc, a także u osób zdrowych, wskazują na istotne różnice elastyczności pomiędzy badanymi grupami. Badania zostały opublikowane w *Journal of Molecular Recognition [AFM-based nanomechanical characterization of bronchoscopic samples in asthma patients (2018), 31(12):e2752]*. Pomiary i analizy są nadal kontynuowane i sugerują, że elastyczność ściany oskrzeli zależy od nasilenia przebudowy oskrzeli oraz wpływa na sposób wentylacji płuc.

Dodatkowo włączyłam się również w realizację projektu prof. dr hab. M. Lekkiej dotyczącego biofizycznych mechanizmów synergii integrzyn i syndekanów w adhezji komórek pęcherza moczowego do elementów strukturalnych macierzy zewnątrzkomórkowej (2015-2019, projekt NCN OPUS-8, *Biofizyczny mechanizm synergii integrzyn i syndekanów w adhezji komórek pęcherza moczowego do elementów strukturalnych macierzy zewnątrzkomórkowej*). Badania były prowadzone w IFJ PAN, Politechnice Poznańskiej (Instytut Fizyki, Wydział Inżynierii Materiałowej i Fizyki Technicznej), Instytucie Fizyki im. M. Smoluchowskiego UJ (Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej), Katedrze Biochemii Lekarskiej UJ CM oraz Katedrze Histologii UJ CM, a wyniki tej współpracy wykazały istotne znaczenie wiązań i interakcji integrzyn i syndekanów z substancją pozakomórkową, wpływających na migrację, adhezję i przerzutowanie komórek nowotworowych. Efektem tej współpracy jest publikacja w czasopiśmie *Micron [Probing the recognition specificity of $\alpha\beta_1$ integrin and syndecan-4 using force spectroscopy (2020), 137:102888]*.

Uczestniczyłam także w badaniach interakcji pomiędzy fibronektyną a skierowanym przeciw niej przeciwciałem monoklonalnym przy wykorzystaniu zarówno mikroskopu sił atomowych (AFM), jak i mikroskopu sił bocznych (LFM). Uzyskane wyniki

zapropowały nową metodę kalibracji sił bocznych do badania oddziaływań między pojedynczymi cząsteczkami. Prace były prowadzone wielośrodkowo, we współpracy z IFJ PAN, Uniwersytetem Mikołaja Kopernika w Toruniu (Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej) i Politechniką Federalną w Lozannie (Ecole Polytechnique Federale de Lausanne) i opublikowane w *Beilstein Journal of Nanotechnology [Probing fibronectin-antibody interactions using AFM force spectroscopy and lateral force microscopy (2018), 15(6)1164-75]*.

Kolejna współpraca z IFJ PAN dotyczyła pomiarów i analizy zarówno histologicznej, jak i reologicznej wycinków mięśni w mysim modelu dystrofii mięśniowej Duchenne'a. Badania właściwości lepkosprężystych mięśni zdrowych, chorych i leczonych autologiczną terapią komórkową były ściśle skorelowane z obrazami histologicznymi włókien mięśniowych. Wyniki badań zostały zawarte w czasopiśmie *Journal of Biomechanics [Rheological properties of skeletal muscles in a Duchenne muscular dystrophy murine model before and after autologous cell therapy (2021), 9(128):110770]*.

Od 2020 r. uczestniczę w realizacji projektu Phys2BioMed, *Biomechanics in health and disease: advanced physical tools for innovative early diagnosis*. Projekt ten otrzymał dofinansowanie z Unii Europejskiej (Horizon 2020). Jest to współpraca wielośrodkowa pomiędzy IFJ PAN, Uniwersytetem w Amsterdamie (Holandia) i Duńskim Uniwersytetem Technicznym w Kopenhadze (Dania). Badania obejmują analizy zmian własności biomechanicznych i mikroreologicznych wielokomórkowych sferoid jako modelu *in vitro* raka pęcherza moczowego. Charakterystyka ich odpowiedzi biomechanicznej ma kluczowe znaczenie dla zrozumienia rozwoju guza, jego progresji i odpowiedzi na lek. Badania histologiczne prowadzone w Katedrze Histologii UJ CM wykazały zmiany w cytoskiecie komórkowym, zawartości włókien kolagenowych oraz ilości składników macierzy zewnątrzkomórkowej. Wyniki tych badań zostały zaprezentowane w trakcie konferencji 12th Annual Symposium "Physics of Cancer" Lipsk, Niemcy (30.08 – 1.09.2021) w formie posteru (przez doktor Kajangi Gnanachandran), który zdobył pierwszą nagrodę: *3D multicellular spheroids as an in vitro model for bladder cancer: a mechanical and microrheological study by means of atomic force microscopy*, first award for the poster for K. Gnanachandran, J. Pabijan, G. Pyka-Fościan, M. Lekka. Powyższe badania są nadal kontynuowane. Obecnie wyniki są

przygotowywane do publikacji jako artykuł oryginalny: *Multiscale Rheology of Aging Cancer Spheroids*. Manuskrypt został wysłany do czasopisma *Biomaterials*.

Byłam także recenzentem artykułów naukowych na zaproszenie redakcji *Journal of Physiology and Pharmacology*.

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

6.1. Działalność dydaktyczna

W czasie studiów doktoranckich prowadziłam zajęcia dydaktyczne z przedmiotu „Zoologia bezkręgowców”, dla studiów stacjonarnych i niestacjonarnych, na kierunku biologia Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi, w Zakładzie Zoologii Systematycznej i Zoogeografii (obecnie Zakład Biologii Rozwoju i Morfologii Bezkręgowców) Uniwersytetu Jagiellońskiego. W tym okresie odbyłam staże i ukończyłam studia podyplomowe, uzyskując uprawnienia nauczycielskie w zakresie kwalifikacji pedagogicznych do pracy w nauczaniu biologii, chemii i przyrody w szkołach podstawowych i ponadpodstawowych. Zarówno prowadzone przeze mnie zajęcia dla studentów, jak i uczniów szkół, pozwoliły zdobyć nie tylko doświadczenie, ale także rozwinąć moją dydaktyczną pasję. Prowadzone przez mnie zajęcia miały na celu nie tylko przekazanie wiedzy, ale przede wszystkim zaszczepienie w umysłach młodych ludzi chęci samodoskonalenia oraz poszukiwania wiedzy. Moje zaangażowanie znalazło wielokrotne uznanie w ankietach przeprowadzonych wśród studentów, dzięki którym znalazłam się w ścisłej czołówce ocenianych dydaktyków.

Istotną częścią mojej pracy jest nadal działalność dydaktyczna, a w ostatnich latach liczba moich godzin dydaktycznych wynosi ponad 500 rocznie. W Katedrze Histologii UJ CM prowadzę zajęcia z histologii i cytofizjologii dla studentów studiów kierunku lekarskiego i lekarsko-dentystycznego, analityki medycznej, wykłady z cytobiologii medycznej, a od 2013 r. w związku z utworzeniem w Krakowie Uniwersyteckiego Centrum Medycyny Weterynaryjnej UJ-UR, prowadzę również zajęcia z histologii na kierunku weterynaria.

Prowadzone przeze mnie zajęcia są realizowane w języku polskim i angielskim (w Szkole Medycznej dla Obcokrajowców UJ CM, School of Medicine in English). Od 2019 r. jestem współkoordynatorem kursu histologii dla studentów DDS (Doctor of Dental Surgery Program in English, School of Medicine in English). Jestem również zaangażowana w koordynowanie współpracy dydaktycznej z VIII Liceum Ogólnokształcącym w Krakowie, której celem jest rozwijanie biologicznych zainteresowań uczniów. W latach 2008-2020 byłam koordynatorką i kierowniczką kursu histologii dla kierunku fizyka medyczna Akademii Górniczo-Hutniczej (Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej) w Krakowie. Prowadziłam także wykłady i ćwiczenia z histologii dla zawodowych studiów podyplomowych analityki medycznej Wydziału Farmaceutycznego UJ CM.

Od 2008 r. kurs histologii, na którym prowadzę zajęcia, został wielokrotnie uznany przez absolwentów UJ CM za najlepszy kurs przedkliniczny. Od początku mojej pracy w Katedrze Histologii jestem bardzo wysoko oceniana w ankietach przeprowadzonych wśród studentów wszystkich kierunków studiów w okresie całego zatrudnienia (mój wynik punktowy to 96-100 punktów na 100 możliwych). Za okres 2009/2010 i 2010/2011 otrzymałam trzy nagrody przyznawane na podstawie ankiet studenckich: nagrodę dla najlepszego asystenta UJ CM kierunku lekarsko-dentystycznego; nagrodę JM Rektora UJ za wysoką jakość pracy dydaktycznej w ramach monitorowania procesu nauczania oraz systematycznej poprawy jakości dydaktyki; a także nagrodę uznającą zaangażowanie w pracę dydaktyczną za wysoką ocenę kursu *Histology* uzyskaną w oparciu o ankiety wypełnione przez studentów Szkoły Medycznej dla Obcokrajowców UJ CM, **załącznik nr 9**. W latach 2020 – 2022 uczestniczyłam w opracowaniu nowych materiałów dydaktycznych umożliwiających prowadzenie zajęć w ramach kształcenia na odległość.

W ramach doskonalenia dydaktycznego uczestniczyłam w wielu warsztatach, szkoleniach i kursach.

6.2. Staże, warsztaty, szkolenia i kursy:

2013: szkolenie *Zaawansowane techniki edukacyjne w naukach medycznych. Kurs zaawansowany – Edukacja medyczna w nauczaniu przedmiotów podstawowych*. Projekt:

„Pro bono Collegii Medici Universitatis Jagiellonicae”. Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków,

2012 – 2013: kurs języka angielskiego w medycynie „Pro bono Collegii Medici Universitatis Jagiellonicae”,

9 – 30.11.2019: kurs z zakresu komunikacji niewerbalnej, *Sceniczne techniki w prowadzeniu zajęć dydaktycznych - ekspresja pozawerbalna*, prowadzony w ramach warsztatów dydaktycznych Ars Docendi, prowadzący: Prof. dr hab. Jan F. Jacko. (kurs 60 godzin, zaliczony z oceną bardzo dobrą),

2020: szkolenie *Zarządzanie stresem* organizowane przez Biuro Karier Uniwersytetu Jagiellońskiego we współpracy z firmą IBM BTO Business Consulting Services,

2020: szkolenie *Public Speaking* organizowane przez Biuro Karier Uniwersytetu Jagiellońskiego we współpracy z firmą IBM BTO Business Consulting Services,

2020: szkolenie *Prawo autorskie w działalności dydaktycznej i naukowej* organizowane w ramach projektu ZintegrUJ - Kompleksowy Program Rozwoju Uniwersytetu Jagiellońskiego. Katedra Prawa Własności Intelektualnej UJ, prowadząca: dr hab. Justyna Ożegalska – Trybalska,

2021: szkolenie *Warsztaty głosu i mowy* w ramach projektu ZintegrUJ - Kompleksowy Program Rozwoju Uniwersytetu Jagiellońskiego, prowadząca: dr Barbara Tritt,

2021: szkolenie *Adaptacja materiałów edukacyjnych do potrzeb osób z niepełnosprawnością wzroku*. Dział ds. Osób Niepełnosprawnych UJ, w ramach projektu „Odpowiedzialne wsparcie i zrównoważony rozwój”, prowadząca: Katarzyna Pyryt,

2021: szkolenie *Coaching jako metoda podniesienia kompetencji dydaktycznych*, prowadząca: mgr Halina Czubała,

2021 – 2023: uczestnictwo w cyklu wykładów *Razem zadbajmy o zmianę kultury akademickiego kształcenia!* Program Strategiczny UJ Inicjatywa Doskonałości - Uczelnia Badawcza (IDUB),

2022: *Co pomaga, a co przeszkadza w pracy?* Akademicki Inkubator Przedsiębiorczości UJ: Efektywny self-managent,

2023: *Emocji moc - regulacja emocji w pracy nauczyciela akademickiego*, kurs prowadzony w ramach warsztatów dydaktycznych *Ars Docendi UJ*, prowadząca: dr Agnieszka Adamczak.

6.3. Działalność popularyzatorska i organizacyjna

W trakcie studiów doktoranckich (2002 – 2006) kilkakrotnie wchodziłam w skład komitetu organizacyjnego konferencji: *Zakopane Conference of Nuclear Physics*.

Od 2008 r. jestem członkiem Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików. W 2018 r. reprezentowałam Katedrę Histologii w ramach Junior Day UJ CM dla kierunków lekarskiego i dentystycznego (wystąpienie dla studentów I roku).

W ramach popularyzacji nauki od 2008 roku uczestniczę w organizacji Festiwalu Nauki w Krakowie, podczas których zespół Katedry Histologii prezentuje preparaty histologiczne oraz przeprowadza barwienia histologiczne i histochemiczne. W latach 2013 – 2015 uczestniczyłam w pokazach edukacyjnych dla dzieci z Przedszkola nr 145 i Szkoły Podstawowej nr 159 w Krakowie w ramach budowania zainteresowania nauką w praktyce (prezentacja doświadczeń). W latach 2017 – 2018 uczestniczyłam w przygotowaniu materiałów i pomocy dydaktycznych do Małopolskiej Nocy Naukowców IFJ PAN.

W ramach popularyzacji osiągnięć współczesnej nauki skierowanej do szerokiego grona odbiorców, przedstawiam również wyniki opublikowanych przez siebie badań naukowych na stronie internetowej uniwersyteckiego serwisu „Po Prostu Nauka” (<https://poprostunauka.cm-uj.krakow.pl>). Od 2021 roku jestem koordynatorem współpracy dydaktycznej w ramach umowy UJ CM z VIII Liceum Ogólnokształcącym w Krakowie, której celem jest rozwijanie biologicznych zainteresowań uczniów, wymiana doświadczeń w zakresie pracy z uczniami szczególnie uzdolnionymi oraz wspomaganie ich rozwoju naukowego przez pracowników naukowych UJ CM. Dzięki tej współpracy uczniowie aktywnie uczestniczą w zajęciach laboratoryjnych Katedry Histologii.

6.4. Nagrody i odznaczenia (załącznik nr 9)

01.10.2002 – 30.09.2003: stypendium Funduszu im. Stanisława Pigonia przeznaczone dla doktorantów wyróżniających się dobrymi wynikami w nauce,

01.10.2004 – 31.07.2005: stypendium Funduszu Stypendialnego im. Stanisława Estreichera (UJ) przeznaczone dla doktorantów za wyróżniające wyniki w nauce i postawę godną Almae Matris,

2009 – 2010: Nagroda dla najlepszego asystenta UJ CM kierunku lekarsko-dentystycznego (nagroda przyznana na podstawie ankiet wśród studentów),

2010 – 2011: Nagroda JM Rektora UJ – nagroda i wyróżnienie za wysoką jakość pracy dydaktycznej w ramach monitorowania procesu nauczania oraz systematycznej poprawy jakości dydaktyki (nagroda przyznana na podstawie ankiet wśród studentów),

2010 – 2011: Nagroda uznająca zaangażowanie w pracę dydaktyczną za wysoką ocenę kursu *Histology* uzyskaną w oparciu o ankiety wypełnione przez studentów Szkoły Medycznej dla Obcokrajowców UJ CM,

2021: Brązowy Medal za Długoletnią Służbę nadany przez Prezydenta RP, wręczony na uroczystym posiedzeniu Senatu UJ z okazji Święta Edukacji Narodowej.

7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.

Aktywnie biorę udział w półmaratonach charytatywnych wspierających chore dzieci. Ostatnim z nich był Półmaraton Marzanny, Kraków 2023, *Biegnij dla małych serc*, Fundacja Schola Cordis Wspierania Kardiochirurgii Dziecięcej Profesora Janusza Skalskiego, ratującej serca najmłodszych.

8. Bibliografia użyta w autoreferacie:

[1] C.S. Constantinescu, N. Farooqi, K. O'Brien, B. Gran, Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS), *Br. J. Pharmacol.* 164 (2011) 707-717.

[2] H. Lassmann, New concepts on progressive multiple sclerosis. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 7 (2007) 239-44.

- [3] G. Pyka-Fosciak, M. Stasiolek, J.A. Litwin, Immunohistochemical analysis of spinal cord components in mouse model of experimental autoimmune encephalomyelitis, *Folia Histochem. Cytobiol.* 56 (2018) 151-158.
- [4] Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria, *Lancet Neurol.* 17(2) (2018) 162-173.
- [5] W. Brück, The pathology of multiple sclerosis is the result of focal inflammatory demyelination with axonal damage, *J. Neurol.* (2005) 252.
- [6] G. Pyka-Fosciak, G.J. Lis, J. A. Litwin, Effect of natalizumab treatment on metalloproteinases and their inhibitors in a mouse model of multiple sclerosis, *J. Physiol. Pharmacol.* 71(2) (2020) 265-273.
- [7] G. Pyka-Fosciak, J. A. Litwin, G.J. Lis, Osteopontin expression and the effect of anti-VLA-4 mAb treatment in experimental autoimmune encephalomyelitis, a mouse model of multiple sclerosis, *Folia Neuropathol.* (2023), 61 (2): 129-137.
- [8] M. Stangel, R. Pul, T. Skripuletz, C. Trebst, E. Voss, V. Gudi, Remyelination in Multiple Sclerosis, *Neuroinflammation*, 2011,193-223.
- [9] M. Clerico, C.A. Artusi, A. Di Liberto, S. Rolla, V. Bardina, P. Barbero, S.F. De Mercanti, L. Durelli, Long-term safety evaluation of natalizumab for the treatment of multiple sclerosis, *Expert Opin. Drug Saf.* 16 (8) (2017) 963–972.
- [10] A. Stylianou, SV. Kontomaris, C. Grant, E. Alexandratou, Atomic Force Microscopy on Biological Materials Related to Pathological Conditions. *Scanning.* 2019 (2019) 8452851.
- [11] J. Wuerfel, F. Paul, B. Beierbach, U. Hamhaber, D. Klatt, S. Papazoglou, F. Zipp, P. Martus, J. Braun, I. Sack. MR-elastography reveals degradation of tissue integrity in multiple sclerosis. *Neuroimage*, 49 (2010) 2520-2525.
- [12] K.J. Streitberger, I. Sack, D. Krefting, C. Pfuller, J. Braun, F. Paul, J. Wuerfel, Brain viscoelasticity alteration in chronic-progressive multiple sclerosis. *PLoS ONE*, 7 (2012) 29888.
- [13] M. Makale. Cellular mechanobiology and cancer metastasis. *Birth Defects Research.* 81 (2007) 329-343.

- [14] D. Wirtz, K. Konstantopoulos, and P. C. Searson, The physics of cancer: the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis. *Nat. Rev. Cancer*, 11(7) (2011) 512-522.
- [15] C. Rotsch and M. Radmacher, Drug-induced changes of cytoskeletal structure and mechanics in fibroblasts: an atomic force microscopy study. *Biophys. J.* 78(1) (2000) 520-535.
- [16] G. Pyka-Fościak, J. Zemła, G.J. Lis, J.A. Litwin, M. Lekka, Changes in spinal cord stiffness in the course of experimental autoimmune encephalomyelitis, a mouse model of multiple sclerosis, *Arch. Biochem. Biophys.* 15 (680) (2020), 108221.
- [17] G. Pyka-Fosciak, M. Stasiolek, J.A. Litwin, Immunohistochemical analysis of spinal cord components in mouse model of experimental autoimmune encephalomyelitis, *Folia Histochem. Cytobiol.* 56 (2018) 151–158.
- [18] M. Stangel, R. Pul, T. Skripuletz, C. Trebst, E. Voss, V. Gudi, Remyelination in Multiple Sclerosis, *Neuroinflammation* (2011) 193-223.
- [19] A. Heredia, C.C. Bui, U. Suter, P. Young, T.E. Schäffer, AFM combines functional and morphological analysis of peripheral myelinated and demyelinated nerve fibers, *Neuroimage.* 37(4) (2007)1218-1226.
- [20] M. Kalli, T. Stylianopoulos, Defining the role of solid stress and matrix stiffness in cancer cell proliferation and metastasis, *Front. Oncol.* 8 (2018).
- [21] J.C. Martens, M. Radmacher, Softening of the actin cytoskeleton by inhibition of myosin II, *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 456 (2008) 95–100.
- [22] A.P. Balgude, X. Yu, A. Szymanski, R.V. Bellamkonda, Agarose gel stiffness determines rate of DRG neurite extension in 3D cultures, *Biomaterials* 22 (2001) 1077-1084.
- [23] L.A. Flanagan, Y. El Ju, B. Marg, M. Osterfield, P.A. Janmey, Neurite branching on deformable substrates, *Neuroreport* 13 (2002) 2411-2415.
- [24] M.C. Murphy, J. Huston, C.R. Jack, K.J. Glaser, A. Manduca, J.P. Felmlee, R.L. Ehman, Decreased brain stiffness in Alzheimer's disease determined by magnetic resonance elastography, *J. Magn. Reson. Imaging* 34 (2011) 494-498.

- [25] A. Romano, J. Guo, T. Prokscha, T. Meyer, S. Hirsch, J. Braun, I. Sack, M. Scheel, In vivo Waveguide elastography: effects of neurodegeneration in patients with amyotrophic lateral sclerosis, *Magn. Reson. Med.* 72 (2014) 1755-1761.
- [26] V.K. Raghunathan, S.M. Thomasy, P. Strøm, B. Yañez-Soto, S.P. Garland, J. Sermenó, C.M. Reilly, C.J. Murphy, Tissue and cellular biomechanics during corneal wound injury and repair, *Acta Biomater.* 58 (2017) 291-301.
- [27] M. Sixt, B. Engelhardt, F. Pausch, R. Hallmann, O. Wendler, L.M. Sorokin, Endothelial cell laminin isoforms, laminins 8 and 10, play decisive roles in T cell recruitment across the blood-brain barrier in experimental autoimmune encephalomyelitis, *J. Cell Biol.* 153 (2001) 933-945.
- [28] K. Schregel, E. Wuerfel nee Tysiak, P. Garteiser, I. Gemeinhardt, T. Prozorovski, O. Aktas, H. Merz, D. Petersen, J. Wuerfel, R. Sinkus, Demyelination reduces brain parenchymal stiffness quantified in vivo by magnetic resonance elastography, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109 (2012) 6650-6655.
- [29] N.A. Losseff, L. Wang, H.M. Lai, D.S. Yoo, M.L. Gawne-Cain, W.I. McDonald, D.H. Miller, A.J. Thompson, Progressive cerebral atrophy in multiple sclerosis A serial MRI study, *Brain* 119 (1996) 2009-2019.
- [30] G. Pyka-Fościk, G.J. Lis, J.A. Litwin, Adhesion Molecule Profile and the Effect of Anti-VLA-4 mAb Treatment in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, a Mouse Model of Multiple Sclerosis. *Int. J. Mol. Sci.* 22 23(9) (2022) 4637.
- [31] G. Pyka-Fościk, J. Zemła, J. Lekki, B. Wójcik, G.J. Lis, J.A. Litwin, M. Lekka, Biomechanical changes in the liver tissue induced by a mouse model of multiple sclerosis (EAE) and the effect of anti-VLA-4 mAb treatment. *Arch. Biochem. Biophys.* 15 728 (2022) 109356.
- [32] J. Greenwood, Y. Wang, V.L. Calder, Lymphocyte adhesion and transendothelial migration in the central nervous system – The role of LFA-1, ICAM-1, VLA-4 and VCAM-1. *Immunology* 86 (1995) 408-415.
- [33] D. Wong, R. Prameya, K. Dorovini-Zis, In Vitro adhesion and migration of T lymphocytes across monolayers of human brain microvessel endothelial cells: Regulation by ICAM-1, VCAM-1, E-selectin and PECAM-1. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58 (1999) 138-152.

- [34] H. Yusuf-Makagiansar, M.E. Anderson, T.V. Yakovleva, J.S. Murray, T.J. Siahaan, Inhibition of LFA-1/ICAM-1 and VLA4/VCAM-1 as a therapeutic approach to inflammation and autoimmune diseases. *Med. Res. Rev.* 22 (2002) 146-167.
- [35] I. Wimmer, S. Tietz, H. Nishihara, U. Deutsch, F. Sallusto, F. Gosselet, R. Lyck, W.A. Muller, H. Lassmann, B. Engelhardt, PECAM-1 stabilizes blood-brain barrier integrity and favors paracellular T-cell diapedesis across the blood-brain barrier during neuroinflammation. *Front. Immunol.* 10 (2019) 711.
- [36] J.L. Baron, J.A. Madri, N.H. Ruddle, G. Hashim, C.A. Janeway, Surface expression of alpha 4 integrin by CD4 T cells is required for their entry into brain parenchyma. *J. Exp. Med.* 177 (1993) 57-68.
- [37] A. Antezana, S. Sigal, J. Herbert, I. Kister, Natalizumab-induced hepatic injury: a case report and review of literature, *Mult. Scler. Relat. Disord.* 4 (6) (2015) 495-498.
- [38] S. Mueller, L. Sandrin, Liver stiffness: a novel parameter for the diagnosis of liver disease, *Hepatic Med.* 2 (2010) 49-67.
- [39] P. Marcellin, Z.M. Ziolkowski, P. Bedossa, C. Douvin, R. Poupon, et al., Non-invasive assessment of liver fibrosis by stiffness measurement in patients with chronic hepatitis B, *Liver Int.* 29 (2009) 242-247.
- [40] M. Ziolkowski, A. Handra-Luca, A. Kettaneh, C. Christidis, F. Mal, et al., Non-invasive assessment of liver fibrosis by stiffness measurement: a prospective multicenter study in patients with chronic hepatitis C, *Hepatology* 41 (2005) 48-54.
- [41] E. Nguyen-Khac, D. Chatelain, B. Tramier, C. Decrombecque, B. Robert, et al., Assessment of asymptomatic liver fibrosis in alcoholic patients using FibroScan: prospective comparison with seven non-invasive laboratory tests, *Aliment. Pharmacol. Ther.* 28 (2008) 1188-1198.
- [42] V.W. Wong, J. Vergniol, G.L. Wong, J. Foucher, H.L. Chan, et al., Diagnosis of fibrosis and cirrhosis using liver stiffness measurement in nonalcoholic fatty liver disease, *Hepatology* 51 (2010) 454-462.
- [43] C. Corpechot, A.E. Naggar, A. Poujol-Robert, M. Ziolkowski, D. Wendum, et al., Assessment of biliary fibrosis by transient elastography in patients with PBC and PSC, *Hepatology* 43 (5) (2006) 1118-1124, 43(5).

- [44] P.C. Georges, J.J. Hui, Z. Gombos, M.E. McCormick, A.Y. Wang, et al., Increased stiffness of the rat liver precedes matrix deposition: implications for fibrosis, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 293 (6) (2007) G1147-G1154.
- [45] S. Marenga, S.-C. Huang, V. Castoldi, R. d'Isa, G. Dalla Costa, G. Comi, L. Leocani, Functional evolution of visual involvement in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Mult. Scler. J. Exp. Transl. Clin.* 6(4) (2020) 2055217320963474.
- [46] C.A. May, E. Lütjen-Drecoll, Morphology of the Murine Optic Nerve. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43 (2002) 2206-2212.
- [47] J. Correale, M.F. Farez, The role of astrocytes in multiple sclerosis progression. *Front. Neurol.* 6 (2015) 180.
- [48] J. Jin, M.D. Smith, C.J. Kersbergen, T.I. Kam, M. Viswanathan, K. Martin, T.M. Dawson, V.L. Dawson, D.J. Zack, K. Whartenby, P.A. Calabresi, Glial pathology and retinal neurotoxicity in the anterior visual pathway in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Acta Neuropathol. Commun.* 7 (2019) 125.
- [49] M. Pisa, J. Pansieri, S. Yee, J. Ruiz, M.I. Leite, J. Palace, G. Comi, M.M. Esiri, L. Leocani, G.C. DeLuca, Anterior optic pathway pathology in CNS demyelinating diseases. *Brain* 145 (2022) 4308-4319.
- [50] G. Pyka-Fościak, M. Fościak, J. Pabijan, G.J. Lis, J.A. Litwin, M. Lekka, Changes in stiffness of the optic nerve and involvement of neurofilament light chains in the course of experimental autoimmune encephalomyelitis, an animal model of multiple sclerosis. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* (2023) 166796.
- [51] M. Bacioglu, L.F. Maia, O. Preische, J. Schelle, A. Apel, S.A. Kaeser, M. Schweighauser, T. Eninger, M. Lambert, A. Pilotto, D.R. Shimshek, U. Neumann, P.J. Kahle, M. Staufenbiel, M. Neumann, W. Maetzler, J. Kuhle, M. Jucker, Neurofilament Light Chain in Blood and CSF as Marker of Disease Progression in Mouse Models and in Neurodegenerative Diseases. *Neuron* 6 91(1) (2016) 56-66.
- [52] T. Uher, M. McComb, S. Galkin, B. Srpova, J. Oechtering, C. Barro, M. Tyblova, N. Bergsland, J. Krasensky, M. Dwyer, E. Kubala Havrdova, H. Posova, M. Vaneckova, R. Zivadinov, D. Horakova, J. Kuhle, M. Ramanathan, NF-L levels are associated with blood-brain barrier integrity, lymphocyte extravasation, and risk factors following the first demyelinating event in multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 7 (2021) 1352458520912379.

[53] T. Loeffler, I. Schilcher, S. Flunkert, B. Hutter-Paier, NF-L as biomarker of neurodegenerative and rare diseases with high translational value. *Front. Neurosci.* 14 (2020) 579.

[54] L. Fague, Y.A. Liu, N. Marsh-Armstrong, The basic science of optic nerve regeneration. *Ann. Transl. Med.* 9(15) (2021) 1276.

[55] D.E. Koser, E. Moendarbary, J. Hanne, S. Kuerten, K. Franze, CNS cell distribution and axon orientation determine local spinal cord mechanical properties. *Biophys. J.* 108 (2015) 2137-2147.

[56] J. Weickenmeier, R. de Rooij, S. Budday, P. Steinmann, T.C. Ovaert, E. Kuhl, Brain stiffness increases with myelin content. *Acta Biomater.* 42 (2016) 265-272.

Grażyna Pyka-Fobciak

(podpis wnioskodawcy)