

Prof. dr hab. Jan Celichowski

Zakład Neurobiologii

Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu

ul. Królowej Jadwigi 27/29

Recenzja

**dorobku naukowego i rozprawy habilitacyjnej pani dr Małgorzaty Nałęcz
w związku z wnioskiem o nadanie stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk
medycznych dyscyplina biologia medyczna**

Wykształcenie, zatrudnienie i sylwetka Habilitantki

Pani dr nauk medycznych Małgorzata Nałęcz (częściowo wskazywana w dokumentacji i publikacjach pod podwójny nazwiskiem, jako Małgorzata Ziemka-Nałęcz) urodziła się w roku 1974 w Otwocku. Aktualnie jest pracowniczką Zakładu Neurobiologii Naprawczej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN w Warszawie. W 1998 po ukończeniu studiów na kierunku biologia na Uniwersytecie im. Mikołaja Kopernika w Toruniu, na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi uzyskała stopień magistra biologii ze specjalizacją w zakresie biologii molekularnej. W 1999 roku rozpoczęła pracę na etacie asystentki w Zakładzie Neurobiologii IMDiK PAN. W roku 2007 uzyskała stopień doktora nauk medycznych po obronie rozprawy wykonanej w Zakładzie Neurobiologii Naprawczej tego Instytutu, zatytułowanej „Wpływ niedokrwienia i reperfuzji na przekąźnictwo sygnałów z macierzy zewnątrzkomórkowej w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego”, pod kierunkiem naukowym pani prof. dr hab. Teresy Zalewskiej. Dostarczone materiały zawierają poświadczoną kopię dyplomu doktorskiego. Warto odnotować, że praca została nagrodzona wyróżnieniem Rady Naukowej IMDiK PAN, co nie jest częstą praktyką. Od roku 2011 do chwili obecnej jest zatrudniona na etacie adiunkta w Zakładzie Neurobiologii IMDiK PAN.

Pani dr Małgorzata Nałęcz posiada w dorobku łącznie 26 indeksowanych publikacji. Jest to dorobek znaczący liczebnie. Z tego wykazu w okresie po habilitacji pochodzi 20 publikacji, z których 13 to publikacje oryginalne, a kolejnych 7 to prace pogładowe, wszystkie te publikacje są ulokowane w czasopiśmie z listy JCR ze współczynnikiem *Impact Factor* w zakresie od 0,910 do 5,193. Łączna wartość tego współczynnika dla wszystkich publikacji oryginalnych Habilitantki wynosi 63,397, a w połączeniu z publikacjami przeglądowymi ten współczynnik łącznie wynosi 82,534. Czasopisma te na listach MNiSW odpowiadają aktualnie od 15 do 40 punktom. W dorobku Habilitantki zwracają uwagę szczególnie 4 publikacje oryginalne odpowiadające 40 pkt MNiSW i 3 kolejne po 35 pkt MNiSW, które ukazały się już w okresie po doktoracie pani Nałęcz, co wskazuje na stopniową poprawę jakości warsztatu i dorobku naukowego. Według punktacji ministerialnej obliczonej dla poszczególnych lat, gdy te artykuły się ukazywały, wszystkie łącznie odpowiadają 516 punktom. Zatem jeden oryginalny, indeksowany artykuł w dorobku pani Nałęcz odpowiada średnio 27,157 punktom MNiSW i wartości wskaźnika *Impact Factor* 3,336. Oprócz publikacji oryginalnych na podkreślenie zasługuje udział autorski Habilitantki w 7 pracach przeglądowych, również w czasopiśmie indeksowanych odpowiadający łącznej wartości współczynnika *Impact Factor* 19,137, a wszystkie te publikacje ukazały się w okresie po doktoracie, w czterech z nich Habilitantka jest pierwszą autorką. Jest to znacząca aktywność na polu podsumowywania aktualnego stanu wiedzy. Wymienione powyżej wartości bibliometryczne można uznać jako wskaźniki wysokiej jakości publikacji Habilitantki, a liczebnie dorobek odpowiada wymogom stawianym przez habilitantom.

Publikacje pani Nałęcz były cytowane ponad 250 razy, a indeks Hirsha wynosi 10. Są to wartości wskazujące na istotne wykorzystanie wyników badań Habilitantki przez międzynarodowe środowisko naukowe. Odpowiadają zarazem zwyczajowym oczekiwaniom stawianym kandydatom do stopnia doktora habilitowanego.

Ocena osiągnięcia naukowego będącego podstawą przewodu habilitacyjnego

Jako swoje główne osiągnięcie naukowe będące podstawą przewodu habilitacyjnego (art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.) pani Nałęcz wskazuje cykl pięciu spójnych tematycznie publikacji zatytułowanych „Regulacja neuro- i gliogenezy w modelach okołoporodowego, hipoksyjno-ischemicznego uszkodzenia mózgu”. Ten cykl publikacji przedstawiony jest w autoreferacie, zawierającym omówione bardzo szeroko i w sposób odpowiadający standardom rozpraw naukowych główne wyniki badań Habilitantki. Sumaryczna wartość współczynnika Impact Factor dla tych 5 publikacji naukowych wynosi 21,891, a publikacje te są ulokowane w czasopismach dla których łączna wartość punktów przyznawanych przez MNiSW wynosi 170. Pod względem wskaźników bibliometrycznych to osiągnięcie naukowe należy uznać jako znaczące, odpowiadające wymaganiom stawianym kandydatom do stopnia doktora habilitowanego. W czterech publikacjach pani Nałęcz jest autorką wyróżnioną, w trzech pierwszą, a w jednej ostatnią i szacuje swój udział w przygotowaniu publikacji na 40-75%, w większości prac wskazuje swój udział w projektowaniu koncepcji i stawianiu hipotez badawczych, co jest istotnym elementem uznania autora pracy jako badacza wiodącego. Ocenę głównego osiągnięcia pani Nałęcz nieco osłabiają dwa fakty, po pierwsze jest autorką korespondującą tylko w jednej z tych pięciu publikacji, a po drugie w jednej z publikacji nie posiada autorstwa wyróżnionego, choć w deklaracji odnoszącej się tego artykułu ocenia swój udział w jego powstaniu na 60% (Jaworska J, Ziemka-Nalecz M, Sypecka J, Zalewska T. The potential neuroprotective role of a histone deacetylase inhibitor, sodium butyrate, after neonatal hypoxiaischemia. *J Neuroinflammation*. 2017, 14, 34).

Główne wyniki badań przedstawione w wybranym cyklu pięciu artykułów

Problematyka jakiej dotyczą wyniki badań pani Nałęcz odnosi się do niedotlenienia i niedokrwienia okołoporodowego. Znaczenie tej problematyki zostało starannie i szeroko przedstawione w samych publikacjach oraz wspólnie podsumowane we wprowadzeniu do autoreferatu Habilitantki, również w odniesieniu do skutków występujących w mózgu. Na tym tle Habilitantka dokonała podsumowania głównych celów swoich doświadczeń i najważniejszych wyników. Badania prowadzone w ramach cyklu publikacji będącej głównym Jej osiągnięciem miały na celu określenie procesów neuro- i gliogenezy w modelach neonatalnej hipoksji-ischemii, poznanie wpływu inhibitora deacetylaz histonów – maślanu sodu na przeżycie, powstawanie i różnicowanie komórek neuralnych oraz modulację reakcji zapalnej w modelu asfiksji okołoporodowej u 7-dniowych szczurów, a także poznanie molekularnego mechanizmu oddziaływania wspomnianego maślanu sodu. Badania te przeprowadzono na dwóch głównych modelach doświadczalnych, mianowicie na modelu *ex vivo* wykorzystującym hodowlę organotypową skrawków hipokampa szczurów poddanych procedurze symulującej warunki ischemiczne oraz na modelu *in vivo*, w którym u 7-dniowych zwierząt indukowano hipoksyjno-ischemiczne uszkodzenie mózgu, a zalety i ograniczenia tych metod zostały omówione w autoreferacie. Również główne wyniki badań i wypływające z nich wnioski są szczegółowo omówione w autoreferacie, a pięć publikacji wchodzących w skład cyklu – osiągnięcia będącego podstawą przewodu habilitacyjnego znajduje się w dostarczonej dokumentacji.

Jako główne osiągnięcia wynikające ze wspomnianego cyklu publikacji należy uznać następujące obserwacje o charakterze oryginalnym:

1. W wyniku niedokrwienia-niedotlenienia zostają zahamowane procesy powstawania oraz dojrzewania neuronów w strefie SGZ hipokampa u rozwijających się zwierząt oraz procesy

oligodendrogenyzy. Szczególnie wrażliwe na hipoksję-ischemię były progenitory oligodendrocytów, których liczba drastycznie spada w hipokampie uszkodzonej półkuli ipsilateralnej, choć ilość wytwarzanej mieliny została określona jako niezmienniona. Natomiast struktura wytworzonej osłonki mielinowej była nieprawidłowa.

2. Zastosowanie maślanu sodu u młodych zwierząt po neonatalnej hipoksji-ischemii miało efekt neuroprotektoryjny i neurogenny, gdyż skutkowało zmniejszeniem uszkodzenia półkuli ipsilateralnej u doświadczalnych zwierząt. Ponadto, efektem działania tego inhibitora było zwiększenie liczby neuroblastów w obu badanych strefach neurogennych oraz progenitorów oligodendrocytów w strefie SGZ hipokampa półkuli uszkodzonej. Z drugiej strony, zastosowanie maślanu sodu nie zwiększało liczby nowopowstałych komórek ziarnistych w hipokampie w półkuli ipsilateralnej wskazując ograniczone charakter działania maślanu sodu w odniesieniu do odtworzenia uszkodzonych neuronów. Ponadto, maślan sodu stymulował powstawanie neuronów o fenotypie dojrzałym wyłącznie w rejonie SVZ półkuli ipsilateralnej.

3. Zastosowany model hipoksji-ischemii aktywował także mikroglej w półkuli ipsilateralnej badanych zwierząt. Maślan sodu powodował wzrost (w okresie do 6 dni po hipoksji-ischemii) lub też znaczne zmniejszenie liczby komórek mikrogleju (w okresie 2 tygodni po hipoksji-ischemii), zastosowanie maślanu sodu stymulowało polaryzację mikrogleju w kierunku fenotypu M2, co prowadzić może do redukcji reakcji zapalnej i procesów naprawczych. Możliwy mechanizm tego działania może być powiązany z obniżeniem poziomu czynników prozapalnych (IL-1 β , chemokiny CXCL10, COX-2, czynnika transkrypcyjnego NF κ B).

Znaczenie powyższych osiągnięć naukowych należy ocenić wysoko. Wyniki te zostały osiągnięte w badaniach wymagających posługiwania się nowoczesnymi, zaawansowanymi technikami laboratoryjnymi. Ich znaczenie dla środowiska naukowego ilustruje systematycznie wzrastająca liczba cytowań publikacji Habilitantki, w tym publikacji wchodzących do omawianego cyklu, z których trzy najwcześniej opublikowane już były 9-16 razy cytowane.

Ocena pozostałych osiągnięć naukowych

We wstępnym okresie pracy naukowej Habilitantka została włączona w badania roli kinazy białkowej C w procesie śmierci komórek nerwowych w hipokampie po krótkotrwałym niedokrwieniu przodomózgowia u chomika mongolskiego. Wyniki badań wykazały spadek poziomu izoform alfa, beta, gamma i delta kinazy białkowej C w części grzbietowej hipokampa i powiązaną z tym aktywację wapniowo zależnych enzymów proteolitycznych - kalpain, a także degradację białek fodryny i MAP-2. W dalszym okresie pracy wiodącym zagadnieniem były procesy przekazywania sygnału z macierzy zewnątrzkomórkowej, w modelach zwierzęcych niedokrwienia mózgu. Wyniki badań z udziałem Habilitantki wykazały, że wzrost aktywności MMP-9 w hipokampie po niedokrwieniu korelował czasowo i przestrzennie z degradacją lamininy - białka macierzy zewnątrzkomórkowej oraz ze śmiercią neuronów piramidowych w rejonie CA1, oraz że w wyniku niedokrwienia przodomózgowia dochodzi do zahamowania aktywności/fosforylacji wewnątrzkomórkowej kinazy tyrozynowej - FAK już na etapie autofosforylacji po upływie 24 godzin po przywróceniu krążenia. Wykryto także jednoczesne obniżenie ekspresji białek FAK i Src, oraz zaobserwowano intrygujący fakt, że profil czasowy obniżenia aktywności kinazy FAK koreluje z aktywacją metaloproteinaz. Te wyniki pozwoliły wnioskować, że proteoliza białek macierzy zewnątrzkomórkowej osłabia interakcję komórek z macierzą, zaburza przekazywanie sygnału za pośrednictwem kinazy FAK, a ostatecznie prowadzi to do opóźnionej śmierci neuronów hipokampa. Badania te były finansowane dzięki uzyskaniu grantu promotorskiego. Powyższe wyniki, ujęte we wspomnianej powyżej rozprawie doktorskiej Habilitantki z roku 2007 spotkały się z wyróżnieniem przez Radę Naukową IMDiK.

Inne badania, które dotyczyły analizy aktywności kinaz FAK, jej homologa - kinazy PYK-2 oraz Src w gęstościach postsynaptycznych błony komórkowej neuronów izolowanych z hipokampa po

krótkotrwałym i długotrwałym niedokrwieniu wykazały wzmożoną interakcję podjednostki NR2B receptora NMDA z badanymi kinazami oraz białkiem PSD-95, oraz wzrost fosforylacji tego receptora, a ponadto wyniki wykazały różnice efektów zależne od czasu trwania niedokrwienia. Habilitantka brała także udział w badaniach szlaku sygnałowego kinazy FAK w modelu asfiksji okołoporodowej, które wykazały hamowanie tej ścieżki po niedokrwieniu w niedojrzałym mózgu, wyrażające się obniżeniem aktywności/fosforylacji kinazy FAK, oraz spadkiem interakcji tego białka z kinazą Src oraz białkiem p130Cas. Kolejny wątek badań dotyczył roli 1-metyl-nikotynamidu (MNA) w modulacji aktywności metaloproteinaz w uszkodzeniu hipoksyjno-ischemicznym, a wyniki badań mają znaczenie dla wyjaśnienia prawdopodobnego mechanizmu terapeutycznego działania MNA. Badania te również zostały wyróżnione nagrodą dyrektora IMDiK PAN.

Po obronie doktoratu Habilitantka kontynuowała badania metaloproteinaz po ischemicznym uszkodzeniu mózgu, rozpoczynając współpracę z Zakładem Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. Nenckiego PAN, w ramach której porównano aktywność MMP-2 i MMP9 w mózgu młodych i starych myszy po niedokrwieniu ogniskowym. Wykryto najszybszy wzrost MMP-9 w obszarze rdzenia udaru w okresie 4 godzin po wywołaniu niedokrwienia, a w strefie okołordzeniowej po 24 godzinach. Stwierdzono brak różnic w aktywności metaloproteinaz pomiędzy zwierzętami w różnym wieku. Habilitantka brała również udział w badaniach dotyczących roli metaloproteinaz w plastyczności synaptycznej, a w badaniach tych wykazano, że wzrost aktywności MMP-9 w korze mózgowej w pobliżu rdzenia udaru koreluje czasowo i przestrzennie z obniżeniem neuroplastyczności. Ponadto wykazano, że podanie inhibitora metaloproteinaz przez wywołaniem ischemii ogniskowej, skutkowało zachowaniem zdolności do tworzenia nowych połączeń synaptycznych w tkance. Kolejny wątek zainteresowań badawczych pani Nałęcz dotyczył neurogenezy w modelu przejściowego niedokrwienia przodomózgowia, a wyniki wykazały różnice w dynamice proliferacji neuralnych komórek macierzystych w dwóch badanych strukturach hipokampa: w zakręcie zębatym (DG) oraz strefie CA1. Wyniki te w połączeniu z badaniami metaloproteinaz wskazują na zaangażowanie tych metaloproteinaz w proces neurogenezy, a publikacja opisująca te badania także została wyróżniona nagrodą dyrektora IMDiK PAN. W ramach innego wątku współpracy z pracownikami Instytutu Farmakologii PAN, dotyczącymi wpływu imipraminy na szlak sygnałowy związany z kinazą FAK oraz kinazą PYK-2 wykazano, że kinazy te charakteryzują się różną odpowiedzią na zastosowanie imipraminy: spadek poziomu oraz fosforylacji i aktywności kinazy FAK, a wzrost aktywności kinazy PYK-2. Ponadto, wykazano wzmocnienie przekazywania poprzez ścieżkę związaną ze kinazą PYK-2 i osłabienie sygnału poprzez kinazę FAK, a obserwacje wskazują na nieznaną dotąd mechanizmów działania imipraminy, mają więc wyraźnie charakter nowatorski. Obserwacje te były poszerzone przez kolejne badania zmian aktywności i fosforylacji wspomnianych kinaz powiązanych z transdukcją sygnału z macierzy zewnątrzkomórkowej w warunkach ograniczenia dostępu tlenu i glukozy, co testowane było na skrawkach hipokampa. Wyniki tych badań Habilitantki wskazały, że ograniczenie dostępu tlenu i glukozy obniżały aktywność i fosforylację kinaz hipokampa.

Jakościowa i ilościowa ocena tej części dorobku Habilitantki jest wysoka, gdyż w swoim autoreferacie wskazuje na znaczącą liczbę istotnych obserwacji skutków niedotlenienia i niedokrwienia, w moim przekonaniu są to badania o dużym znaczeniu naukowym, wykonywane częściowo we współpracy z pracownikami innych instytutów, choć słabą stroną dorobku jest brak wyraźnych wątków współpracy międzynarodowej.

Doświadczenie w zakresie realizacji grantów badawczych, staże naukowe i dorobek dydaktyczny

Pani Małgorzata Nałęcz w trakcie pracy w IMDiK PAN uzyskiwała dwa granty na prowadzone badania, w których pełniła rolę kierownika. Były to granty NCN 2017/27/B/NZ3/00582 „Inhibitory deacetylaz histonów jako potencjalne czynniki modelujące reakcję zapalną indukowaną w mózgu po neonatalnej asfiksji u szczurów” (realizowany jeszcze obecnie) i projekt NCN 2012/05/NZ3/00436 „Stymulacja endogennej neurogenezy jako nowa strategia terapeutyczna w modelu asfiksji

okołoporodowej szczura” (realizowany w latach 2013-2016). W pięciu kolejnych projektach, wykazanych w dokumentacji, była wykonawcą lub głównym wykonawcą. Ma więc znaczące doświadczenie w zakresie realizacji i kierowania projektami badawczymi pozyskiwanymi w trybie konkursowym.

Wątki współpracy międzynarodowej w dorobku pani dr Nałęcz są raczej skromne, w autoreferacie wykazuje dwukrotne (w roku 2003 i 2004) dwutygodniowe staże studyjne w Centre Nationale la Recherche Scientifique (CNRS), Faculte de Medicine Nord, Université de la Méditerranée w Marsylii, we Francji których celem była nauka techniki zymografii in situ, wykorzystanej w badaniach skrawkach mózgu myszokoczka mongolskiego. Znalazłem tylko jedną pracę wykonaną we współpracy międzynarodowej (L. Wójcik-Stanaszek, J. Sypecka, P. Szymczak, M. Ziemka-Nałęcz, M. Khrestchatisky, S. Rivera, T. Zalewska. The potential role of metalloproteinases in neurogenesis in the gerbil hippocampus following global forebrain ischemia. Opublikowane w: PLoS One, 2011).

Pani dr Nałęcz ma dość skromny dorobek dydaktyczny, co jest bardzo częstą słabością (choć niezawinioną) pracowników instytutów badawczych, nie prowadzących regularnej działalności dydaktycznej. Niemniej, objęła opieką naukową kilkoro studentów różnych uczelni (dwie prace magisterskie i kilka staży naukowych) i lekarzy w toku specjalizacji. Co wydaje być ważnym aspektem w niniejszej recenzji, trzykrotnie została powołana do pełnienia funkcji promotora pomocniczego: pani dr Joanny Jaworskiej - przewód ukończony, pani mgr Justyny Janowskiej (przewód otwarty od 2016 roku) i pani mgr Pauliny Pawelec (przewód otwarty od 2019 roku). Dwukrotnie brała udział w komisjach oceniających studenckie i doktoranckie prace oraz trzykrotnie recenzowała prace nadsyłane do czasopism indeksowanych. Habilitantka otrzymała 8 nagród i wyróżnień instytutowych, a także trzykrotne stypendia na udział w kongresach. Należy podkreślić, że trzy z pięciu publikacji wchodzących do cyklu będącego podstawą ocenianej habilitacji zostały wyróżnione nagrodami dyrektora IMDiK (poz. 2 i 3 w cyklu), bądź Zespołową Nagrodą Wydziału V Polskiej Akademii Nauk w roku 2018 (poz. 2, 3, 4, t.j. Ziemka-Nałęcz M, Jaworska J, Sypecka J, Polowy R, Filipkowski RK, Zalewska T. Sodium Butyrate, a Histone Deacetylase Inhibitor, Exhibits Neuroprotective/Neurogenic Effects in a Rat Model of Neonatal Hypoxia-Ischemia. Mol Neurobiol. 2017, 54 (7), 5300-5318; Jaworska J, Ziemka-Nałęcz M, Sypecka J, Zalewska T. The potential neuroprotective role of a histone deacetylase inhibitor, sodium butyrate, after neonatal hypoxiaischemia. J Neuroinflammation. 2017, 14 (1), 34; Ziemka-Nałęcz M, Janowska J, Strojek L, Jaworska J, Zalewska T, Frontczak-Baniewicz M, Sypecka J. Impact of neonatal hypoxia-ischaemia on oligodendrocyte survival, maturation and myelinating potential. J Cell Mol Med. 2018 Jan; 22 (1): 207222). Taka nagroda jest znaczącym wyróżnieniem, w roku 2018 tą nagrodę przyznano tylko dwóm zespołom.

Podsumowanie recenzji i wniosek końcowy

Reasumując, przedstawione osiągnięcie, jakim jest cykl pięciu oryginalnych publikacji z wiodącym w większości publikacji udziałem Habilitantki stanowią znaczące osiągnięcie naukowe. Jednocześnie całość dorobku naukowego pani doktor Małgorzaty Nałęcz odpowiada ustawowym wymogom stawianym kandydatom do stopnia doktora habilitowanego. Tematyka badań przedstawionych zarówno w ramach cyklu stanowiącego główne osiągnięcie Habilitantki, jak i w pozostałych publikacjach w ramach dorobku jest spójna i mieści się w obszarze dziedziny nauk medycznych, w dyscyplinie biologia medyczna. W związku z powyższym popieram skierowany do Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN wniosek pani doktor Małgorzaty Nałęcz o nadanie stopnia doktora habilitowanego nauk medycznych.

Poznań, 29.07.2019

