

Prof. dr hab. Barbara Oderfeld-Nowak , prof. em.

Warszawa , 19 maja 2014

Instytut Biologii Doświadczalnej

im. M.Nenckiego PAN

02-093 Warszawa , ul. Pasteura 3

## OCENA

Dorobku naukowego , aktywności naukowej oraz rozprawy habilitacyjnej (Osiągnięcia naukowego) **dr. Joanny Sypeckiej**, w związku z postępowaniem o nadanie stopnia doktora habilitowanego , w dziedzinie nauk medycznych, w dyscyplinie biologia medyczna

Jako recenzent oraz członek Komisji Habilitacyjnej zapoznałam się ze wszystkimi materiałami dotyczącymi postępowania habilitacyjnego dr. Joanny .Sypeckiej., (wyszczególnionymi we wniosku dr. Sypeckiej z dnia 12 grudnia 2013 r, do Centralnej Komisji do Spraw Stopni i Tytułów , o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego), przedstawionymi w formie odrębnych załączników.

Dokumentacja wniosku została przygotowana wzorowo , wyjątkowo starannie i elegancko oraz zgodnie z wymaganiami stosownych przepisów prawnych, tj. z wytycznymi Centralnej Komisji do Spraw Stopni i Tytułów.

### **Droga zawodowa habilitantki**

Pani dr. Joanna Sypecka ukończyła studia na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego , uzyskując w roku 1990 stopień magistra biologii ( promotor: prof.dr hab Zbigniew Kwiatkowski). W latach 1991-1996 odbywała studia doktoranckie w Zakładzie Neurochemii Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, pod kierunkiem Profesor Krystyny Domańskiej –Janik. W roku 1996 uzyskala stopień naukowy doktora nauk przyrodniczych , na podstawie rozprawy pt:” Plejotropowe oddziaływanie mutacji genu PLP u królika Pt”. Praca została nagrodzona wyróżnieniem Rady Naukowej IMDiK PAN oraz wyróżnieniem w konkursie im. Aurelii Baczko na najlepszą pracę w dziedzinie nauk medycznych w 1996 roku. W latach 1997-2005 dr. Sypecka była zatrudniona jako asystent w Zakładzie Neurobiologii Naprawczej IMDiK PAN , im. M. Mossakowskiego, a od roku 2006 pracuje w tym Zakładzie na etacie adiunkta..

## **Ocena całokształtu dorobku naukowego oraz działalności naukowo-dydaktycznej i organizacyjnej**

Kandydatka do stopnia dr habilitowanego ma bardzo dobre przygotowanie do pracy naukowej. Wyśmienity start dały jej już studia doktoranckie ( w latach 1991-1996) które odbywała pod kierunkiem tak wybitnej uczoney jaką jest Pani Profesor Krystyna Domańska – Janik. Trudno sobie wyobrazić lepszy start dla młodej adeptki nauki. Pod kierunkiem Profesor Domańskiej-Janik zyskała możliwość prowadzenia badań nad występującą u królików dziedziczną chorobą neurodegeneracyjną o charakterze leukodystrofii. Charakterystyczne objawy tej choroby przyczyniły się do nadania jej nazwy Pt , skrót od angielskiego terminu paralytic tremor, tłumaczonego jako drżączka porażna. Uzyskane dane z tego okresu pozwoliły m.inn na ocenę królika pt jako odpowiedniego modelu zwierzęcego, odzwierciedlającego występującą u ludzi chorobę Pelizausa-Merzbachera.

W okresie tym zdobywała również szlify naukowe podczas 8 miesięcznego pobytu na Uniwersytecie w Lozannie pracując pod kierunkiem profesora J-M. Matthieu nad molekularnym podłożem chorób dysmielinizacyjnych

Wyniki prowadzonych w okresie studiów doktoranckich badań stanowiły przedmiot pracy doktorskiej zatytułowanej “Plejotropowe oddziaływanie mutacji genu PLP u królika Pt”. , wyróżnioną przez Radę Naukową CMDiK PAN oraz w konkursie im. Aurelii Baczeko na najlepszą pracę doktorską w dziedzinie nauk medycznych w 1996 roku.

Po obronie pracy doktorskiej habilitantka przez pewien czas prowadziła jeszcze dalsze badania choroby pt, publikując kilka prac z tej dziedziny. Następnie uwaga habilitantki zwróciła się głównie ku procesom funkcjonowania komórek oligodendrocytarnych, ich progenitorów, procesów gliogenezy oraz poszukiwania możliwości naprawy uszkodzonej tkanki nerwowej. Włączyła się w badania prowadzone w Zakładzie Neurobiologii Naprawczej IMDiK PAN, dotyczące poszukiwania źródeł komórek progenitorów oligodendrocytów w celu wykorzystania ich do potencjalnych terapii naprawczych i. zaangażowała się w badania mające na celu charakterystykę in vitro neuralnych komórek macierzystych linii HUCB-NSC.

Zasadnicza część dorobku naukowego habilitantki po doktoracie dotyczy właśnie wymienionych zagadnień. Kwintesencją tych badań jest cykl 8 publikacji, które stanowią Osiągnięcie naukowe, będące podstawą wniosku o nadanie stopnia naukowego doktora habilitowanego.

Ostatnie badania habilitantki dotyczą również prób otrzymywania indukowanych pluripotentnych komórek macierzystych a także badań dotyczących ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych, pochodzących z galarety Whartona, izolowanej ze sznura pępowinowego.

Habilitantka jest autorką lub współautorką 24 artykułów opublikowanych w anglojęzycznych czasopismach indeksowanych w bazie ISI Web of Science , z czego 21 to prace oryginalne. W 15 z wymienionych prac habilitantka jest pierwszym autorem a w 4 występuje jako drugi autor. Dorobek po doktoracie to 18 artykułów. Sumaryczny współczynnik oddziaływania (IF), w/g Journal Citation Reports, zgodnie z rokiem opublikowania, wynosi 44.505, a punktacja KBN/MNiSW równa się 385. Całkowita liczba cytowań ( w/g bazy ISI Web of Science) wynosi 132 ( bez autocytowań 102 ), indeks Hirscha wynosi 7.

Ponadto habilitantka jest autorem lub współautorem dwu rozdziałów w książkach, Za swą pracę badawczą zdobywała szereg nagród.

Wyrazem aktywności naukowej habilitantki jest również współautorstwo w bardzo wielu ( 57) komunikatach, przedstawianych podczas konferencji i sympoziów naukowych ,międzynarodowych (49) i krajowych(9), z czego 43 komunikaty pochodzą z okresu po doktoracie.

Do osiągnięć naukowych dr. Sypeckiej należy zaliczyć fakt uczestniczenia w realizacji wielu projektów badawczych, wielokrotnie w charakterze kierownika projektu lub głównego wykonawcy. Obecnie jest głównym wykonawcą w 3 projektach badawczych.

W ramach działalności edukacyjnej wspomnieć należy sprawowanie przez habilitantkę opieki nad praktykantami, magistrantami oraz doktorantami prowadzącymi prace badawcze w Zakładzie Neurobiologii Naprawczej IMDiK PAN, a także wykłady dla uczestników Studiów Doktoranckich IMDiK PAN. , czy w charakterze zaproszonego wykładowcy w Szkole Zimowej Instytutu Farmakologii PAN poświęconej zagadnieniom gleju.

Wspomnieć jeszcze należy o wielokrotnym recenzowaniu artykułów dla czasopism anglojęzycznych

Od roku 2013 habilitantka jest koordynatorem merytorycznym z ramienia IMDiK PAN ( Partner Projektu) w Zespole zarządzającym projektem “ Nowoczesne metody, leki i terapie w ochronie zdrowia i gospodarce Europy XXI wieku”.

## **Ocena rozprawy habilitacyjnej (Osiągnięcia naukowego) przedstawionej w postaci monotematycznego cyklu publikacji**

Osiągnięcie naukowe, będące podstawą do wystąpienia o stopień naukowy doktora habilitowanego, stanowi cykl ośmiu spójnych tematycznie publikacji, zatytułowany: "Charakterystyka progenitorów oligodendrocytarnych oraz ocena wpływu lokalnego mikrośrodowiska na rozwój i funkcje oligodendrocytów.", w których p.dr. Sypecka jest autorem lub współautorem.

Jedna publikacja jest wyłącznego autorstwa dr. Sypeckiej (udział autorki zatem 100 %); w pięciu jest ona pierwszym autorem a w pozostałych dwu, drugim autorem. W większości zatem prac habilitantka pełniła rolę wiodącą i była autorką koncepcji badawczej oraz osobą głównie przygotowującą manuskrypt pracy a także wykonującą większą część pracy eksperymentalnej. Autorka szacuje swój udział w powstaniu tych publikacji, w ujęciu procentowym, na około 80%. W pozostałych dwu publikacjach swój udział procentowy autorka szacuje na 30 i 40%. Do dokumentacji dołączono oświadczenia wszystkich współautorów tych prac, potwierdzające istotny udział dr. Sypeckiej w powstaniu publikacji oraz wyrażające zgodę na ich włączenie do Osiągnięcia naukowego habilitantki. Wszystkie prace są opublikowane w anglojęzycznych czasopismach, o znaczącym współczynniku oddziaływania (IF), cztery z nich, jak praca w Stem Cells (IF bliski 8), praca opublikowana w Molecular Neurobiology, oraz w PLoS One czy Cell Proliferation, mają wysoki IF, pozostałe cztery, opublikowane w anglojęzycznych czasopismach wydawanych w kraju, mają IF nieco mniejszy (sumaryczny IF wszystkich prac wynosi 25.817). W tym miejscu pragnęłabym zwrócić uwagę na fakt, że właśnie dzięki publikowaniu części znaczących osiągnięć naukowych w czasopismach wydawanych w kraju, bardzo podnosi się ranga tych czasopism na arenie międzynarodowej i wzrasta bardzo znacząco ich IF (np. w ciągu ostatnich kilku lat IF Acta Neurobiol. Experimentalis wzrósł z około 0.4 do około 2).

Zagadnienie, któremu poświęcony jest omawiany cykl prac, należy do wyjątkowo aktualnych i ważkich. Nie ulega najmniejszej wątpliwości, że poznanie czynników wpływających na prawidłowe funkcjonowanie komórek glejowych a w szczególności zbadanie właściwości komórek oligodendrogleju i ich progenitorów i ich roli w mielinizacji jest ściśle związane z postępem poszukiwań skutecznych terapii w szeregu schorzeń układu nerwowego, nie tylko tych związanych z demielinizacją ale i szeregu zaburzeń neurodegeneracyjnych o różnym podłożu. W szczególności, badania neuralnych komórek

macierzystych , poznanie różnych aspektów procesu gliogenezy , czynników wpływających na ten proces i charakterystyka właściwości progenitorów glejowych , posiada niezwykle ważne znaczenie w określeniu ich przydatności w opracowaniu terapii komórkowych.

Perfekcyjnie przygotowany przez habilitantkę autoreferat , omawia bardzo dokładnie znaczenie takich prac, przedstawia także, w jaki sposób kolejno uzyskiwane w obecnym cyklu prac wyniki stawały się przesłankami dla habilitantki do stawiania kolejnych hipotez badawczych, które doprowadzały ją do konsekwentnie zaplanowanych dalszych prac eksperymentalnych. Doskonale napisany autoreferat daje też obraz ogólniejszego podsumowania znaczenia całości cyklu badawczego, wkładu do nauki własnych osiągnięć zauważanych przez autorkę . Daje to jasny obraz własnych dokonań habilitantki.

Badania omawiane w cyklu przedstawianych publikacji prowadzone były w Zakładzie Neurobiologii Naprawczej, kierowanym początkowo przez Profesor Krystynę Domańską-Janik a obecnie przez Profesor Barbarę Łukomską.

W pierwszej publikacji cyklu : *Different vulnerability to cytotoxicity and susceptibility to protection of progenitors versus mature oligodendrocytes*, Sypecka J , 2003, Pol.J.Pharmacol., 55,881-885, autorka w badaniach in vitro , na hodowlach z kory mózgowej kilkunasto-dniowych embrionów szczurzych, wykazała ,że progenitory oligodendrocytów są bardziej podatne na stres oksydacyjny aniżeli dojrzałe oligodendrocyty, co może uzasadniać obserwowane skutki czasowego niedotlenienia w okresie okołoporodowym. Wyniki zwróciły uwagę autorki na zjawisko gliogenezy i poszukiwanie czynników stymulujących ten proces, co było przedmiotem badań w następnych kilku pracach, prowadzonych z wykorzystaniem ludzkich neuralnych komórek macierzystych, pochodzących z krwi pępowinowej.

W drugiej publikacji cyklu: *Laminin promotes oligogliogenesis and increases MMPs activity in human neural stem cells of HUCB-NSC line*, Sypecka J, Dragun-Szymczak P, Zalewska T, Domańska-Janik K, 2009, Acta Neurobiol Exp (Wars),69,37-45, autorzy stwierdzili ,że wśród przebadanych składników macierzy zewnątrzkomórkowej, najbardziej efektywnie promującym gliogenezę czynnikiem jest laminina, której działanie pozwalało na wielokrotne zwiększenie wydajności procedury otrzymywania in vitro populacji oligodendrocytów z ludzkich neuralnych komórek macierzystych. Wyniki badań wskazały również na

zaangażowanie w procesy gliogenezy metaloproteinaz, co skierowało uwagę habilitantki i współautorów na kontynuowanie eksperymentów nad mechanizmem udziału metaloproteinaz w innych badaniach zarówno procesów gliogenezy jak i neurogenezy.

W trzeciej publikacji cyklu: *The potential role of metalloproteinases in neurogenesis in the gerbil hippocampus following global forebrain ischemia*, Wójcik-Stanaszek L, Sypecka J, Szymczak P, Ziemka-Nałęcz M, Khrestchatisky M, Rivera S, Zalewska T, 2011, PLoS One, 6 (7), e 22465., będącej owocem wieloosrodkowej współpracy badaczy, uzyskano wyniki dotyczące porównania działania inhibitorów metaloproteinaz procesu neurogenezy w modelu *in vitro* z warunkami *in vivo* w modelu uszkodzenia ischemicznego. Wskazały one na udział tych enzymów w rekrutacji i różnicowaniu endogennych komórek prekursorowych. Wyniki badań wskazujące na modulowanie *in vitro* procesu gliogenezy, promujące efektywność otrzymywania komórek oligodendrocytowych z neuralnych komórek macierzystych z krwi pępowinowej stały się motorem następnych badań.

W czwartej publikacji cyklu: *A human stem-cell-based model for identifying adverse effects of organic and inorganic chemicals on the developing nervous system*, Bużańska L, Sypecka J, Nerini-Molteni S, Compagnoni A, Hogberg HT, del Torchio R, Domańska-Janik K, Zimmer J, Coecke S, 2009, Stem Cells, 27 (10) 2591-601, będącej następnym owocem wieloosrodkowej współpracy badaczy, autorzy przeprowadzili szereg testów toksykologicznych nad wpływem wybranych substancji, znajdujących zastosowanie min. jako składniki leków, czy substancji obecnych w zanieczyszczonym środowisku, na przeżywalność różnych typów komórek neuralnych i wykazali zróżnicowaną wrażliwość tych komórek.

Wyniki badań wskazujące m.in. na wrażliwość oligodendrocytów na działanie czynników zewnątrzkomórkowych stały się dla habilitantki impulsem do badań *ex vivo*, w serii kolejnych trzech prac, z zastosowaniem organotypowych skrawków z układu nerwowego

W piątej publikacji cyklu: *Crucial role of the local micro-environment in fate decision of neonatal rat NG2 progenitors*, Sypecka J, Sarnowska A, Domańska-Janik K, 2009, Cell Prolif. 42 (5), 661-71, zastosowano bardzo pomysłowy układ doświadczalny, mianowicie współhodowlę oczyszczonej frakcji komórek progenitorów oligodendrocytarnych, uzyskanych z hodowli z kory mózgowej osesków szczurzych, wysiewanej bezpośrednio na powierzchnię organotypowych skrawków hipokampa z mózgu młodych szczurów, zatem

pozostających we współhodowli w bezpośrednim kontakcie. . Zastosowanie nieinwazyjnego znacznika komórek progenitorowych ( świecącego na zielono) pozwalało wybiórczo śledzić zachowanie się tych właśnie komórek. Uzyskano szereg bardzo interesujących wyników wskazujących m.inn. na fakt zróżnicowania się części progenitorów w tych warunkach w komórki o fenotypie neuronalnym. Wyniki wskazały na wyraźny wpływ mikrośrodowiska na losy komórek progenitorów oligodendrogleju , co więcej, wskazały iż progenitory oligodendrocytarne, rozproszone w parenchymie mózgu, posiadają wiele cech typowych dla neuralnych komórek macierzystych ( mi.inn cechowały się obecnością nestyny i wykazywały aktywność proliferacyjną).

Wyniki tych badań będące podstawą postawienia przez habilitantkę hipotezy iż progenitory oligodendrocytarne są komórkami multipotencjalnymi , doprowadziły do przeprowadzenia następných eksperymentów.

W szóstej publikacji cyklu : *Differentiation of glia-committed NG2 cells: the role of factors released from hippocampus and spinal cord*, Sypecka J, Sarnowska A, Gadomska-Szablowska I, Łukomska B, Domańska-Janik K , 2013, Acta Neurobiol Exp (Wars), 73 ,117-130, przeprowadzono doświadczenia w których progenitory i skrawki tkankowe nie pozostawały w bezpośrednim kontakcie ( współhodowla pośrednia, w odróżnieniu od poprzednio zastosowanej – bezpośredniej) . Użyto nie tylko skrawków hipokampa, ale i rdzenia kręgowego. , zatem z tkanek układu nerwowego pochodzących z odległych rejonów. Nadto, część skrawków hipokampa poddano deprivacji tlenowej i glukozy. Uzyskano szereg bardzo interesujących wyników, które pozwoliły na stwierdzenie parakrynnego charakteru sygnałów pochodzących z mikrośrodowiska tkankowego, co w szerszym aspekcie pozwala myśleć o farmakologicznym oddziaływaniu na los przeszczepianých komórek.

Wyniki te stały się powodem zaplanowania następných eksperymentów.

W siódmej publikacji cyklu: *Heterogeneity of local tissue microenvironment influences differentiation of oligodendroglial progenitors*, Sypecka J, Sarnowska A, 2013 , Folia Neuropathol, 51(2), 103-110, zbadano stosując układ doświadczalny pośredniej współhodowli, jak w pracy poprzedniej, warunki związane z ewentualnym powstawaniem astrocytów pod wpływem rozpuszczalnych czynników pochodzenia tkankowego,.

Wyniki uzyskane w tej i dwu poprzednich pracach, oparte na współhodowlach skrawków organotypowych z progenitorami oligodendrocytarnymi, wskazujące na lepsze zachowanie struktury tkankowej w skrawkach z hipokampa w obecności komórek OPC, doprowadziły

habilitantkę do postawienia kolejnej, wyjątkowo ciekawej hipotezy, dotyczącej potencjalnych neuroprotektynowych właściwości progenitorów oligodendrocytarnych i do zaplanowania odpowiednich eksperymentów w celu sprawdzenia tego przypuszczenia.

W ósmej publikacji cyklu: *The neuroprotective effect exerted by oligodendroglial progenitors on ischemically impaired hippocampal cells*, Sypecka J, Sarnowska A, 2014, *Molecular Neurobiol*, 49, 685-701, wykazano iż progenitory oligodendrocytów rzeczywiście mają zdolność sekrecji czynników neuroprotektynowych, a także stymulujących proliferację komórek oraz modulację lokalnej odpowiedzi immunologicznej. W pracy tej zastosowano również współhodowlę skrawków organotypowych hipokampa, uszkodzonych przez deprywację tlenu i glukozy, z frakcją izolowanych *in vitro* progenitorów oligodendrocytarnych w warunkach kontaktu pośredniego. Użyto cały szereg technik w tym molekularnych i m.in. zidentyfikowano i przebadano działanie kilku substancji neurotroficznych.

W mojej opinii ta praca zasługuje na szczególną uwagę. Jest to praca wyjątkowo nowatorska, jej wyniki rzucają zupełnie nowe światło na rolę progenitorów oligodendrogleju. Tylko zupełnie pojedyncze prace w literaturze, i to w innych modelach, wskazywały iż komórki progenitorów oligodendrogleju, w warunkach uszkodzenia dorosłych mózgow mogą syntetyzować niektóre substancje neurotroficzne.

Podsumowując wyniki przedstawione w monotematycznym cyklu publikacji stanowiących podstawę rozprawy habilitacyjnej, należy stwierdzić iż jest to dzieło dojrzałe, o dużej naukowej doniosłości, pełne inwencji badawczej, nowatorskie w wielu aspektach i posiadające niezaprzeczone znaczenie aplikacyjne. Bardzo istotne jest opracowanie metody otrzymywania oligodendrocytów z neuralnych komórek macierzystych pochodzących z ludzkiej krwi pępowinowej

Uzyskane wyniki stanowią istotny wkład nie tylko w rozwój wiedzy na temat właściwości progenitorów oligodendrocytarnych i niektórych zagadnień związanych z gliogenezą, ale wnoszą bardzo istotny wkład w opracowanie skutecznych podejść w terapii komórkowych w chorobach demielinizacyjnych i neurodegeneracyjnych.

Oceniając na podstawie przedstawionego cyklu prac zdolności i umiejętności habilitantki pragnęłabym podkreślić jej wyjątkową zdolność obserwacji i wyciągania wniosków, a także



wyjatkową intuicję w stawianiu śmiałych hipotez. Na podkreślenie zasługuje także dysponowanie wyjątkowo bogatym warsztatem metodycznym i znakomita orientacja w piśmiennictwie.

## **Podsumowanie**

Bardzo wysoko oceniam osiągnięcie naukowe, będące podstawą rozprawy habilitacyjnej jak i całokształt dorobku naukowego dr. Sypeckiej. Uważam, że dr. Joanna Sypecka jest badaczem kompetentnym, zaangażowanym, pełnym pasji naukowej i co niezwykle istotne pełnym ciekawych, wynikających również z kontynuacji obecnych badań, projektów na przyszłość, ważnych również z punktu widzenia ich bezpośredniej aplikacji dla terapii komórkowej w chorobach neurodegeneracyjnych i demielinizacyjnych. Uzasadnia to pełni uzyskanie przez nią samodzielności naukowej. Zarówno dorobek naukowy jak i Osiągnięcie naukowe spełniają wymagania ustawowe w zakresie nadania stopnia naukowego dr habilitowanego. Zatem, z najwyższym przekonaniem, kieruję do Komisji powołanej w celu przeprowadzenia postępowania habilitacyjnego dr. J. Sypeckiej wniosek o wystąpienie do Rady Naukowej Instytutu Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, im. M. Mossakowskiego, o nadanie dr. Joannie Sypeckiej stopnia naukowego doktora habilitowanego.