Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych
Katedra Fizjologii Zwierząt i Neurobiologii
ul. Lwowska 1, 87-100 Toruń
tel. 56 611 26 34
(2292)

Toruń, dnia 13.12.2019r

dr hab. Justyna Rogalska, prof. UMK
Katedra Fizjologii Zwierząt i Neurobiologii
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych
UMK

Ocena osiągnięcia naukowego oraz dorobku naukowego Pani dr Małgorzaty Nałęcz w związku z postępowaniem o nadanie stopnia doktora habilitowanego

Podstawa formalna recenzji i uwagi wstępne

Recenzja niniejsza sporządzona została na podstawie dokumentacji przesłanej mi 10 listopada 2019 r, przez prof. dr hab. Leonorę Bużańską, dyrektora Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN w związku z postępowaniem habilitacyjnym dr Małgorzaty Nałęcz.

Sylwetka Habilitantki

Pani dr Małgorzata Nałęcz jest absolwentką Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. W 1998 roku we wspomnianej jednostce uzyskała tytuł magistra z zakresu biologii molekularnej. W 1999 roku została zatrudniona na stanowisku asystenta w Zakładzie Neurobiologii IMDiK PAN, gdzie w 2007 roku uzyskała dyplom doktora nauk medycznych. W 2011 roku została awansowana na stanowisko adiunkta w Zakładzie Neurobiologii IMDiK PAN.

Ocena osiągnięcia naukowego wskazanego jako podstawa do nadania stopnia doktora habilitowanego

Na osiągnięcie naukowe dr Małgorzaty Nałęcz zatytułowane **„Regulacja neuro- i gliogenezy w modelach okołoporodowego, hipoksyjno-ischemicznego uszkodzenia mózgu"** składa się cykl pięciu oryginalnych prac badawczych opublikowanych w latach 2013-2019. Wszystkie te prace zostały opublikowane w czasopismach indeksowanych w JCR z listy A. Pięcioletni współczynnik wpływu (Impact Factor) czasopism, w których opublikowano prace z cyklu wynosi w kolejności: 2,24; 5.076; 5.193; 4.302; 5.076 (razem: **21,891**). Są to więc czasopisma renomowane. Sumaryczna liczba punktów za te publikacje wynosi 170 punktów

MNiSW, co jest wartością więcej niż przyzwoitą. Wszystkie prace składające się na osiągnięcie naukowe zrealizowane zostały w zespołach wieloautorskich. Trzeba jednak podkreślić, że Habilitantka jest pierwszym autorem w 3 z nich, w jednej drugim i w jednej ostatnim; natomiast tylko w jednej jest autorem korespondencyjnym. Udział w tworzeniu prac wynosi od 40 do 75%. W załączniku nr 6 znajdują się oświadczenia pozostałych współautorów publikacji, w których w sposób opisowy przedstawiono udział w przygotowaniu prac, ale nie ma przypisanej wartości procentowej tego udziału. Pozostaje jedynie domniemywać, że udział procentowy Habilitantki w przygotowanie prac został skonsultowany ze współautorami.

Na podstawie oświadczenia Habilitantki można stwierdzić, że rzeczywiście jej udział w badaniach był kluczowy, szczególnie w kontekście opracowania koncepcji badań, przeprowadzenia eksperymentów, analizy i interpretacji wyników oraz pisania prac. Ranga czasopism świadczy o tym, że wspomniane wyżej prace przeszły przez rygorystyczną procedurę recenzencką i redaktorską, więc ich jakość nie budzi zastrzeżeń. Ponieważ nie ma potrzeby ponownej ewaluacji merytorycznej poszczególnych publikacji, wystarczy ocena ich wzajemnego związku, spójności całego zestawu prac oraz tego czy stanowią one istotny wkład do nauki.

Niedotlenienie okołoporodowe, zwłaszcza w połączeniu z niedokrwieniem mózgu, jest jednym z największych i najpowszechniej występujących niebezpieczeństw w życiu ssaków. Dotyczy to szczególnie biologii człowieka, ponieważ konsekwencją pionizacji ciała jest znaczne utrudnienie i przedłużenie porodu, co pociąga za sobą ryzyko silnego niedotlenienia mózgu noworodków.

Uszkodzenia mózgu na skutek jego niedotlenienia/niedokrwienia mają charakter postępujący, a ich rozwój jest wieloetapowy i nie ogranicza się jedynie do epizodu niedotlenienia, ale – paradoksalnie ulega przyspieszeniu po przywróceniu dostawy tlenu do organizmu. Taka charakterystyka patologii niedotlenienia okołoporodowego powoduje, że zaburzenia funkcjonowania mózgu mogą pojawić się w czasie odległym od epizodu niedotlenienia w postaci zaburzeń reakcji stresowej czy upośledzenia pamięci, a nawet w dorosłym życiu, jako różnego typu choroby neurodegeneracyjne. Trzeba również podkreślić, że szczególnie wrażliwe na niedotlenienie są wcześniaki (taki model został użyty w badaniach Habilitantki – rozwój mózgowia u 7-dniowych szczurów jest adekwatny do rozwoju mózgowia u wcześniaków ludzkich). Konsekwencje niedotlenienia okołoporodowego są zróżnicowane, złożone i często trudne do przewidzenia. Z tego powodu od wielu lat poszukuje się skutecznych metod terapeutycznych, zapobiegających lub zmniejszających

uszkodzenia mózgu indukowane niedotlenieniem okołoporodowym. Badania Habilitantki wpisują się w ten nurt badawczy.

Koncepcja badań uwzględniała w pierwszym etapie analizę neuro- i oligodendrogenezy po hipoksyjno-ischemicznym uszkodzeniu mózgu. Jest to punkt wyjścia do wytypowania mechanizmów, które mogłyby podlegać farmakologicznej modulacji i w konsekwencji niwelować uszkodzenia mózgu. W okresie postnatalnym nowe neurony powstają jedynie w dwóch rejonach mózgu: strefie okołokomorowej (SVZ) i strefie podziarnistej w zakręcie zębatym hipokampa (SGZ). Neuralne komórki macierzyste stwierdzono także w rejonie CA1 hipokampa, prążkowiu i korze mózgowej, obszarach, które ze względu na wysoki poziom przemian metabolicznych potrzebują wysokich nakładów energetycznych, co z kolei determinuje ich szczególną wrażliwość na niedotlenienie. Wspomniane komórki macierzyste w warunkach patologicznych mogą różnicować się w neurony. A zatem wspomaganie procesu neurogenezy w uszkodzonym mózgu jest szczególnie istotne.

Badania przeprowadzone w ramach ocenianego osiągnięcia naukowego wykazały, że hipoksja/ischemia nie wpływa na poziom neurogenezy we wczesnym okresie po uszkodzeniu.

Natomiast w 2 i 4 tygodniu odnotowano znaczny spadek liczby (50%) nowopowstałych neuroblastów oraz dojrzałych neuronów ziarnistych w zakręcie zębatym hipokampa, co potwierdza postępujący charakter uszkodzeń.

Dla prawidłowego rozwoju układu nerwowego niezbędny jest prawidłowy proces mielinizacji neuronów. Przeprowadzone badania in vitro wykazały, że ograniczenie dostępu do tlenu i glukozy powoduje ubytek progenitorów oligodendrocytarnych (OPC) i zaburzenie dojrzewania oligodendrocytów w organotypowych skrawkach hipokampa. Wyniki te nie znalazły 100% potwierdzenia w badaniach na modelu in vivo – wykazano również spadek poziomu progenitorów oligodendrocytarnych, natomiast nie odnotowano wpływu hipoksji-ischemii na dojrzewanie oligodendrocytów. Kolejne badania sugerują, że obniżenie zdolności OPC do dojrzewania i migracji, może wynikać ze spadku aktywności żelatynaz (metaloproteinaz, MMPs). Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej uczestniczą w proteolizie strukturalnych składników macierzy oraz receptorów komórka-komórka i komórka-macierz zewnątrzkomórkowa, a zatem ich udział w procesie migracji komórek w dojrzewającym mózgu jest bardzo prawdopodobny.

Badania wykazały również zaburzenia struktury mieliny po niedokrwieniu/niedotlenieniu. Prawidłowy proces mielinizacji w okresie dojrzewania mózgu

jest kluczowy dla komunikacji neuronalnej, a jego zaburzenia mogą być podłożem zaburzeń neurorozwojowych.

W kolejnym etapie badań zweryfikowano wpływ ***maślanu sodu - inhibitora deacetylaz histonów na procesy neurogenezy po ischemii okołoporodowej. Habilitantka wykazała, że i***schemia powoduje zaburzenie procesu neurogenezy, który nawet w warunkach fizjologicznych jest procesem ograniczonym. Biorąc pod uwagę, że neurogeneza może mieć ogromne znaczenie w niwelowaniu uszkodzeń mózgu poszukiwanie potencjalnych skutecznych mediatorów tego procesu jest jak najbardziej uzasadnione.

Szereg badań naukowych potwierdziło neuroprotekcyjne działanie maślanu sodu, m. in. na drodze stymulacji procesu neurogenezy. Habilitantka również wykazała zmniejszenie uszkodzeń mózgu po podaniu tego związku w zastosowanym modelu ischemii-reperfuzji i w kolejnych eksperymentach zweryfikowała wpływ maślanu sodu na mechanizmy, które leżą u podłoża neurogenezy: 1. proliferacja neuronów oraz oligodendrocytów w rejonach neurogennych SGZ oraz SVZ, 2. ekspresja neurotrofiny BDNF i aktywacja jego receptora – TrkB; 3. poziom acetylacji alfa-tubuliny – białka niezbędnego dla prawidłowego przebiegu transportu aksonalnego.

Podanie maślanu sodu zwierzętom po hipoksji-ischemii:

Ad. 1 znacząco zwiększyło liczbę nowych neuroblastów i przywróciło do poziomu kontrolnego obniżoną po HI liczbę progenitorów oligodendrocytów w zakręcie zębatym hipokampa; a w strefie okołokomorowej stymulowało powstawanie i dojrzewanie neuroblastów.

Ad.2 zwiększyło znacząco ekspresję BDNF (zarówno jego prekursora pro-BDNF jak i formy dojrzałej), jak również ekspresję receptora TrkB oraz jego formy ufosforylowanej/aktywnej.

Ad.3 spowodowało wzrost acetylacji alfa-tubuliny.

Wiadomo, że jednymi z kluczowych mechanizmów patogenezy uszkodzeń mózgu indukowanych hipoksją/ischemią są apoptoza i reakcja zapalna. Maślan sodu nie hamuje procesu apoptozy, natomiast ważnym miejscem uchwytu dla jego neuroprotekcyjnej aktywności okazał się mikroglej. Szczególnie interesujący jest wynik wskazujący na dominację przeciwzapalnego fenotypu komórek mikrogleju po zastosowaniu maślanu sodu.

Przeprowadzone badania potwierdziły wielokierunkowy protekcyjny profil działania maślanu sodu w odniesieniu do wybranych osiowych procesów leżących u podłoża indukowanego hipoksją-ischemią uszkodzenia mózgu.

Dosyć zaskakujące są wyniki dotyczące zmian w zachowaniu zwierząt po hipoksji – ischemii. Zastosowana procedura z założenia powinna skutkować ubytkiem masy tkanki w półkuli hipoksyjno-ischemicznej (ipsilateralnej). Badania przeprowadzone przez dr Nałęcz, również wskazują na zaburzenia na poziomie molekularnym. Natomiast wyniki testów behawioralnych nie odzwierciedlają tych uszkodzeń. Stwierdzono jedynie zaburzenia pamięci w teście water-maze i zaburzenia w teście Wokalizacji Ultradźwiękowych. Nawet tych nielicznych zaburzeń nie udało się w pełni zniwelować po podaniu maślanu sodu. Charakter zmian patologicznych po niedotlenieniu ma charakter postępujący, istnieją badania, które wskazują na pojawienie się zauważalnych deficytów behawioralnych dopiero po roku od epizodu niedotlenienia. Ponadto w trakcie rozwoju osobnika zmienia się charakterystyka zaburzeń behawioralnych u szczurów, np. u dwutygodniowych szczurów wyraźna jest nadaktywność ruchowa, a u szczurów starzejących się - wyraźny spadek aktywności w porównaniu do zwierząt kontrolnych, co oczywiście jest odzwierciedleniem koincydencji naturalnych mechanizmów leżących u podstaw behawioru typowego dla etapu życia osobnika i zmian patologicznych – indukowanych niedotlenieniem okołoporodowym, które jak wspomniałam mają charakter postępujący. Sądzę, ze korzystna byłaby weryfikacja zachowań behawioralnych zwierząt po hipoksji-ischemii w dłuższej perspektywie czasowej i być może zaplanowanie dodatkowych testów behawioralnych.

Prace, które wchodzą w skład osiągnięcia naukowego dr Małgorzaty Nałęcz zostały starannie zaplanowane i wykonane. Zawarta w nich dokumentacja naukowa jest jednoznaczna i bardzo wysokiej jakości. Niewątpliwie, rozprawa habilitacyjna dr Małgorzaty Nałęcz stanowi znaczące osiągnięcie naukowe, poszerzające wiedzę na temat patomechanizmu hipoksji/ischemii okołoporodowej. Jest to szczególnie ważne, ponieważ pozwala na typowanie nowych miejsc docelowych dla potencjalnych leków. Analiza treści publikacji wchodzących w skład osiągnięcia nie budzi wątpliwości co do tego, że tworzą spójną całość, natomiast ta spójność powinna być bardziej wykazana w komentarzu autorskim do tych prac. Przede wszystkim brakuje wyraźne sformułowanych hipotez badawczych.

Uzyskane wyniki oraz wypływające z nich wnioski mają duże znaczenie, nie tylko poznawcze ale również praktyczne. Można przypuszczać, że po uzyskaniu stopnia doktora habilitowanego nastąpi przyspieszenie dalszego rozwoju naukowego Habilitantki. **Podsumowując tę część recenzji uważam, że dr Małgorzata Nałęcz jest dojrzałym, samodzielnym pracownikiem naukowym, a jej osiągnięcie naukowe oceniam jako znaczące.**

Ocena osiągnięć naukowo-badawczych

Prace, które stanowią dorobek uzupełniający Habilitantki w większości dotyczą również patomechanizmu hipoksji-ischemii. Nurty badawcze, w które była zaangażowana dr Nałęcz to: 1. rola kinazy białkowej C (PKC) w śmierci komórek nerwowych w hipokampie po krótkotrwałym, całkowitym niedokrwieniu przodomózgowia u chomika mongolskiego; 2. regulacja procesu przekazywania sygnału z macierzy zewnątrzkomórkowej w modelach zwierzęcych niedokrwienia mózgu (lokalizacja i aktywność zewnątrzkomórkowych enzymów proteolitycznych – metaloproteinaz (MMP-2 i MMP-9; a także poziom oraz aktywność białek sygnałowych związanych z integrynowym szlakiem sygnałowym.); 3. analiza aktywności i szlaku sygnałowego kinazy FAK u myszoskoczka mongolskiego po krótkotrwałym (5-minutowym) i długotrwałym (30 minutowym) niedokrwieniu, a także w modelu asfiksji okołoporodowej u szczurów; 4. rola 1-metyl-nikotynamidu (MNA) w modulacji aktywności metaloproteinaz po hipoksji-ischemii u 7-dniowych osesków szczurzych; 5. porównanie aktywności żelatynaz (MMP-2 i MMP-9) w mózgu myszy młodych i starych po niedokrwieniu ogniskowym; 6. rola metaloproteinaz w procesach plastyczności synaptycznej; 7. rola sygnału zewnątrzkomórkowego w procesie neurogenezy w hipokampie w modelu przejściowego niedokrwienia przodomózgowia myszoskoczka mongolskiego; 8. wpływ związku antydepresyjnego- imipraminy na szlak sygnałowy związany z kinazą FAK oraz jej homologiem kinazą PYK-2. Efektem tych badań jest 21 publikacji w czasopismach z listy filadelfijskiej (w tym 14 z listy A).

Według dokumentacji, po doktoracie Habilitantka opublikowała 20 prac w czasopismach z listy JCR. Łącznie na dorobek naukowy dr Małgorzaty Nałęcz składa się 26 prac opublikowanych w czasopismach indeksowanych w JCR: z czego 19 w czasopismach z listy A (spośród nich 5 składa się na osiągnięcie naukowe). Sumaryczny IF wszystkich publikacji z listy A wynosi 63,397, a suma punktów MNiSW tych prac wynosi 516. Łączna punktacja dorobku naukowego dr Małgorzaty Nałęcz: IF- 82,534, punktacja MNiSW – 686, Indeks Hirscha – 10 (Web of Science); to moim zdaniem bardzo dobry wynik na etapie habilitacji. Warto przy tym wspomnieć, że Habilitantka kilkukrotnie była nagradzana za publikacje, w których jest współautorem (nagrody dyrektora IMDiK PAN ; Nagroda Wydziału V Polskiej Akademii Nauk)

Habilitantka dwa razy kierowała projektem finansowanym przez NCN (2017/27/B/NZ3/00582 i 2012/05/NZ3/00436), co świadczy o umiejętności projektowania badań, które są wartościowe i spotykają się z pozytywną oceną recenzentów.

Współpraca międzynarodowa Habilitantki jest raczej słabo rozwinięta. Odbyła dwa dwutygodniowe (2003, 2004) wyjazdy szkoleniowe do Centre Nacionale la Recherche Scientifique (CNRS), Faculte de Medicine Nord, Université de la Méditerranée w Marsylii (Francja). Wyjazdy miały na celu naukę techniki zymografii *in situ,* umożliwiającej ocenę aktywności MMP-9 i MMP- 2 w tkance i opracowanie protokołu podwójnych barwień immunohistochemicznych na skrawkach mózgu myszoskoczka mongolskiego. Pomimo iż pobyty były krótkie, to jednak udało się nawiązać dłuższą współpracę z dr Santiago Riverą z CNSR w Marsylii. Owocem tej współpracy jest wspólna publikacja:

Wójcik-Stanaszek, J. Sypecka, P. Szymczak, **M. Ziemka-Nałęcz**, M. Khrestchatisky, **S. Rivera**, T. Zalewska (2011) The potential role of metalloproteinases in neurogenesis in the gerbil hippocampus following global forebrain ischemia. PLoS One 6, e22465 doi: 10.1371/journal.pone.0022465; (IF – 4,092 MNiSW – 40).

Dorobek naukowy Habilitantki świadczy, że prowadzenie badań na dobrym poziomie w macierzystym ośrodku jest możliwe. Niemniej jednak, czasowa zmiana otoczenia naukowego oraz poznanie metod i organizacji pracy w innych dobrych zespołach, zwłaszcza zagranicznych, poszerza horyzonty i zainteresowania naukowe oraz pozwala spojrzeć na wiele problemów naukowych z nowej strony. Mogłoby to przynieść tylko korzyść i przyspieszyć karierę naukową.

Wyniki swoich badań, dr Nałęcz prezentowała na konferencjach o zasięgu krajowym jak i międzynarodowym.

Podsumowując, uważam że uzyskane osiągnięcia naukowo-badawcze świadczą o wysokich kwalifikacjach dr Nałęcz. Pozwalają one prognozować, że będzie ona efektywnym samodzielnym uczonym.

Ocena dorobku dydaktycznego i aktywności w zakresie popularyzacji nauki i działalności organizacyjnej

Dr Nałęcz była recenzentem publikacji w czasopismach: Acta Neurobiologiae Experimentalis, (2 recenzje: 2016, 2018) i Pharmacological Reports, (1 recenzja: 2018), co nie jest liczbą imponującą. Trudno wnioskować z czego to wynika. Kierowanie przez redaktorów czasopism manuskryptów do recenzji jest wyrazem uznania danego naukowca za eksperta. Pisanie recenzji jest czasochłonne i jednocześnie mało doceniane, ale jest to ważna praca, rozwijająca i doskonaląca wieloaspektowe spojrzenie na proces badawczy.

IMDiK PAN jest instytucją naukową, stąd doświadczenie dydaktyczne dr Nałęcz nie jest duże, nie mniej jednak sprawowała opiekę naukową i była promotorem studentów z

innych jednostek, którzy realizowali prace magisterskie w IMDiK PAN. Była również opiekunem praktyk studenckich w Zakładzie Neurobiologii Naprawczej IMDiK PAN

Na podkreślenie zasługuje duże zaanagażowanie Habilitantki w rozwój młodej kadry – pełniła funkcję **promotora pomocniczego** dr Joanny Jaworskiej (uzyskanie stopnia doktora: 2018) i obecnie jest promotorem pomocniczym w dwóch przewodach doktorskich.

Wniosek końcowy

Według mojej oceny, osiągnięcie naukowe i ogólny dorobek Pani dr Małgorzaty Nałęcz spełniają warunki formalne określone w art. 18 a ust. 5 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule w zakresie sztuki (Dz U. z 2017 r. poz. 1789), zwana dalej ustawą, w zw. z art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz U. z 2018r. poz. 1669), dlatego też wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN w Warszawie o nadanie Pani dr Małgorzacie Nałęcz stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk medycznych, w dyscyplinie biologia medyczna.

Justyna Rogalska

Dr hab. Justyna Rogalska, prof. UMK