

Gdańsk, 30.12.2020

Recenzja w postępowaniu habilitacyjnym dr n.med Marcina Surmiaka, w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne

I. Ocena osiągnięcia naukowego „Udział granulocytów obojętnochłonnych w patogenezie ziarniniakowatości z zapaleniem naczyń”.

Osiągnięcie naukowe stanowią 4 prace oryginalne, o łącznym współczynniku oddziaływania 13,231 i 295 punktach MNiSW. We wszystkich pracach kandydat jest pierwszym autorem. Wszystkie prace są wieloautorskie – odpowiednio 6, 7, 5 i 9 autorów, a swój udział kandydat określa zbiorczo, jako 60%. Do dokumentacji dołączono oświadczenia współautorów deklarujące ich udział w poszczególnych pracach i wyrazili zgodę na przedłożenie prac jako rozprawę habilitacyjną dr Surmiaka, jednocześnie uznali oni jego wkład w rozwój medycyny. Prace zostały opublikowane w latach 2015-2020.

Tematyka prac jest zgodna z tytułem osiągnięcia naukowego. We wstępie do habilitacji kandydat omawia bardzo krótko poglądy na temat patogenezy ziarniniakowatości z zapaleniem naczyń (GPA), w szczególności rolę granulocytów obojętnochłonnych, omawiając klasyczny mechanizm aktywacji tych komórek w przebiegu GPA, a jednocześnie podkreślając, że może istnieć inny mechanizm aktywacji granulocytów w tej chorobie, regulujący tworzenie pułapek zewnątrzkomórkowych (NET).

Cykl prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego miał za zadanie zbadanie czy istnieje taki mechanizm i na czym on polega. W pierwszej pracy przedstawiono badania wykrywające pochodzenie DNA, krążącego we krwi pacjentów z GPA. Metodą PCR w czasie rzeczywistym oceniono poziom niejądrowego DNA i mitochondrialnego DNA (mtDNA). W tej pracy potwierdzono podwyższoną obecność mtDNA u pacjentów z aktywną postacią GPA, w porównaniu z pacjentami z GPA w remisji i osób zdrowych, co więcej poziom wolnego krążącego mtDNA korelował z aktywnością choroby, co sugerowało istotną rolę tego zjawiska w patogenezie zaostrzeń GPA. Z uwagi na złożoność metody PCR w czasie rzeczywistym nie zastosowano tej

metody w praktyce diagnostycznej. Pojawiły się jednocześnie sugestie w literaturze, że nowym obiecującym markerem aktywności GPA może być oznaczenie w surowicy krwi poziomu kompleksów DNA z białkami uwalnianymi przez aktywowane neutrofile. Hipotezę tę sprawdzono w pracy 2, w której oceniano stężenie enzymów proteinazy-3 (Pr-3), elastazy neutrofilowej (NE) i mieloperoksydazy (MPO) oraz poziomu kompleksów tych białek z wolno krążącym DNA. Stwierdzono wyższe stężenia wszystkich badanych enzymów, natomiast wykryto tylko kompleksy mieloperoksydaza-DNA, które występowały w większej ilości we krwi pacjentów z aktywną postacią choroby i korelowały z tą aktywnością. Dodatkowym sugerowanym mechanizmem wpływającym na aktywację granulocytów i tworzenie NET może być agregacja krążących granulocytów obojętnochłonnych z płytkami krwi; w pracy wykazano podwyższony procent krążących agregatów neutrofilów i płytek, ponownie u osób z aktywną postacią GPA. Dodatkowo procent tych agregatów korelował z stężeniem kompleksu MPO-DNA oraz z aktywnością choroby. Tutaj jedna uwaga techniczna dotycząca terminologii, poziom jest określeniem mało precyzyjnym, w sytuacjach gdy używamy technik ELISA – to sugerowałabym słowo „stężenia”. Tym bardziej słowo „poziom” wydaje mi się nieadekwatne do użycia przy technice cytometrii przepływowowej – w której określone są odsetki czy MFI. Oczywiście, wiem, że prace są już opublikowane, ale to sugestia na przyszłość. **Podsumowując 2 pierwsze prace wchodzące w skład osiągnięcia habilitacyjnego można stwierdzić, że wykonane badania potwierdziły istotną rolę aktywacji granulocytów obojętnochłonnych i tworzenia neutrofilowych pułapek zewnątrzkomórkowych w patogenezie GPA, szczególnie w czasie aktywnej postaci choroby, i są to pierwsze prace o tej tematyce, noszą znamiona nowości a nawet odkryć naukowych.**

Praca trzecia skupia się na procesie apoptozy neutrofilów, i weryfikuje hipotezę czy proces apoptozy jest zaburzony w neutrofilach u osób z GPA. Nie do końca jasny jest związek apoptozy z zwiększoną ilością krążącego mtDNA, skoro we wcześniejszych pracach sugerowano, że mtDNA pochodzi z komórek nieapoptotycznych. Pomijając ten aspekt – sama praca zaprojektowana jest dobrze, zastosowano w niej różne metody – od cytometrii przepływowowej, poprzez hodowle komórkowe, ELISA do ekspresji genów zaangażowanych w proces apoptozy. Uzyskano ciekawe wyniki, u pacjentów z GPA występuje niższy odsetek apoptotycznych granulocytów, związany z zaburzeniem ekspresji genów zaangażowanych w ten proces w neutrofilach. Kierunek zaburzenia wskazuje na obniżenie ekspresji genów hamujących apoptozę

z równoczesnym zwiększeniem ekspresji genów hamujących ten proces. Badania in vitro – hodowle neutrofilów przez 24 godziny wykazały zjawisko opóźnionej apoptozy tych komórek pochodzących od pacjentów z GPA w porównaniu z neutrofilami pochodzącymi od osób zdrowych, w komórkach hodowanych wielkość ekspresji 93 genów regulujących proces apoptozy nie różniła się. Dlatego logicznym następnym etapem było zbadanie, czy na ten proces nie mają wpływu krążące cytokiny i inne mediatory białkowe. Po przebadaniu stężeń 12 białek w surowicy, istotnie statystycznie różnice wykryto dla 4 cytokin: TNF, GM-CSF, s-Fas i PTX3, spośród których, tylko stężenie PTX3 było istotnie wyższe u pacjentów z większą aktywnością choroby. Stężenie PTX3 pozytywnie korelowało z aktywnością choroby oraz z stężeniem kompleksów DNA-MPO, co pozwoliło autorom na postulowania, że PTX3 jest biomarkerem aktywacji neutrofilii i tworzenia pułapek zewnątrzkomórkowych. Tutaj drobna uwaga, wiele ciekawych elementów metodycznych tej pracy i część wyników odsyła do materiałów dodatkowych, których nie dołączono do dokumentacji, a szkoda. Ryzykowna jest też korelacja uzyskanych wyników ze świeżo pobranej krwi pacjentów z GPA z innymi badaniami tych samych pacjentów sprzed kilku lat (opublikowanych w pracy 2), nie jest jasne w jakim stanie klinicznym byli pacjenci w 2 różnych czasach, mogli mieć wysoką aktywność choroby nadal – po kilku latach, lub remisję po leczeniu. **Udowodnienie roli stężenia PTX3 jako biomarkera aktywacji neutrofilów wymagałoby potwierdzenia w jednoczasowym badaniu, ale sugestia jest atrakcyjna dla potencjalnej diagnostyki w przyszłości.**

W celu udowodnienia bezpośredniego wpływu TNF na proces apoptozy neutrofilów przeprowadzono hodowle komórkowe na neutrofilach pochodzących od osób zdrowych w i bez obecności TNF. Po 24 godzinach stymulacji potwierdzono więcej żywych neutrofilów w obecności TNF, z jednoczesnymi zmianami ekspresji genów w kierunku anty-apoptotycznym. Nie do końca jest jasne, dlaczego wybrano TNF, skoro TNF ma opisane zarówno działanie pro-apoptotyczne, jak i proliferacyjne, w zależności od występowania rodzaju receptorów dla TNF na powierzchni komórek i sygnalizacji wewnątrzkomórkowej. Moim zdaniem nie podjęto w tej pracy próby wyjaśnienia tego zjawiska. **Podsumowując tę pracę autorzy zaproponowali sieć regulacyjną apoptozy w granulocytach obojętnochłonnych, która podsumowuje badane procesy i pokazuje ich złożoność regulacyjną.**

Czwarta praca z cyklu koncentruje się na zbadaniu nieklasycznego mechanizmu aktywacji neutrofilów u pacjentów z GPA. W pracy wykazano rolę pęcherzyków

zewnątrzkomórkowych (egzosomów, EV) w aktywacji neutrofilów u pacjentów z aktywną postacią ziarniniakowatości z zapaleniem naczyń, Praca potwierdziła, że egzosomy pochodzące od pacjentów aktywną postacią GPA powodują produkcję reaktywnych form tlenu oraz tworzenie neutrofilowych pułapek zewnątrzkomórkowych, ale procesy te wymagają obecności GM-CSF. Procesów tych nie zaobserwowano przy zastosowaniu egzosomów pochodzących od osób zdrowych. W dalszej części pracy zbadano profil oksylipin w EV z użyciem metody HPLC-MS/MS. Wykryto 14 oksylipin, z których najwyższe stężenia w EV pochodzących od pacjentów z GPA wykazały leukotrien-B4 (LTB4), kwas 5-hydroksyeikozotetraenowy (5-HETE) i kwas 5-okso-eikozatetraenowy (5-oxo-EETE). Stymulacja granulocytów z użyciem LTB4 i 5-oxo-EETE prowadziła do produkcji wolnych rodników i tworzenia NET w obecności GM-CSF. Dodatkowo w pracy podjęto się próby wizualizacji tego procesu z użyciem mikroskopu konfokalnego i barwników uwidoczniających DNA jądrowe i mitochondrialne. **Badania te potwierdziły, że tworzone przez neutrofile aktywowane EV lub LBT4 i 5-oxo-EETE pułapki zewnątrzkomórkowe zawierają mitochondrialne DNA, co jest bardzo ładnym dopięciem cyklu prac, nawiązującym do 1. pracy cyklu.** Niestety podobnie jak w poprzedniej pracy wiele ciekawych materiałów jest zapewne zawarte w materiałach dodatkowych, których nie zawarto w dokumentach, co dziwniejsze nie znalazłam ich także w pracy opublikowanej dostępnej w PubMed. Nie umniejsza to w żadnym razie osiągnięciu, ale trochę utrudnia ocenę.

Podsumowując cykl prac zgłoszonych jako osiągnięcie habilitacyjne – prace oryginalne, z większościowym udziałem Kandydata, wykonane metodycznie starannie, z zastosowaniem licznych technik laboratoryjnych: izolacji wolno krążącego DNA, reakcji PCR w czasie rzeczywistym, izolacji neutrofilów, izolacji krążących pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EV); badań ilościowych białek – ELISA; oceny markerów powierzchniowych neutrofilów, krążących agregatów neutrofile/płytki krwi, oceny powierzchni pęcherzyków zewnątrzkomórkowych metodą cytometrii przepływowowej; a także zbadanie składu oksylipin w EV metodą HPLC-MS/MS; metody hodowli komórkowej neutrofilów; badanie regulacji apoptozy z wykorzystaniem techniki RT-PCR w czasie rzeczywistym, opisujące nowo odkryte mechanizmy aktywacji neutrofilów u pacjentów z rzadką chorobą ziarniniakowatości z zapaleniem naczyń (GPA) są logicznym i konsekwentnym dziełem spełniającym kryteria ustawy odnośnie prac habilitacyjnych.

Jest to cykl 4 prac powiązanych tematycznie, stanowiących istotny wkład Autora w rozwój badań patogenezą GPA.

II. Ocena dorobku naukowego

Dorobek naukowy wg analizy bibliometrycznej na dzień 7 stycznia 2020 roku – przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora: 7 prac oryginalnych i 2 prace przeglądowe o łącznym IF=11,046 i punktach MNiSW=129. Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora: 19 prac oryginalnych i 2 prace przeglądowe o łącznym IF=72,783, punktach MNiSW=950. Zestawienie dorobku naukowego przed uzyskaniem stopnia doktora i po jego uzyskaniu wykazuje znaczny przyrost tego dorobku, który spełnia kryteria znacznej aktywności naukowej.

Tematyka badawcza kandydata zmieniła się w okresie po doktoracie w stosunku do tematyki przed doktoratem. Przed doktoratem publikacje wydają się być dość przypadkowe, prawdopodobnie wynikało to z różnych współprac naukowych prowadzonych w miejscu zatrudnienia. Natomiast po doktoracie dorobek stał się bardziej spójny. Tematyka badawcza obejmowała 3 główne obszary. Pierwszy – badanie aktywacji komórek układu odpornościowego w chorobach o podłożu autoimmunologicznym, w szczególności zagadnienia związane z sygnalizowaniem międzykomórkowym poprzez pęcherzyki zewnątrzkomórkowe u pacjentów z GPA. Badania te były związane z pobytem stażowym w Yale School of Medicine oraz w Instytucie Farmakologii Uniwersytetu w Bernie. Jedna z prac związana z tym tematem badawczym wchodzi w cykl prac osiągnięcia naukowego. W tym obszarze Kandydat jest pierwszym autorem 4 prac oryginalnych, co potwierdza Jego zainteresowanie tym zagadnieniem i konsekwencją realizację.

Drugi obszar badań to badania w szerokim temacie: fizjologia przewodu pokarmowego, co wiązało się z miejscem pracy Habilitanta. W tym obszarze ma najwięcej prac, wynikających z realizacji różnych projektów, w których był wykonawcą.

Trzeci obszar to badania nad nowymi biomateriałami i ich zastosowanie w medycynie, bardzo dynamicznie rozwijający się obszar medycyny, badania prowadzone w ramach projektów międzynarodowych we współpracy z Instytutem Metalurgii Materiałowej PAN w Krakowie oraz licznymi partnerami zagranicznymi.

Prace habilitanta zostały zacytowane łącznie 285 razy w według bazy Web of Science Core Collection (bez autocytowań), a indeks Hirscha według bazy Web of Science Core Collection =12.

Podsumowując dorobek naukowy dr Marcina Surmiaka uważam, że habilitant posiada bardzo dobry dorobek naukowy, spełniający kryteria znaczącej aktywności naukowej do uzyskania stopnia naukowego doktora habilitowanego; habilitant wykazuje stały rozwój naukowy po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych.

III. Ocena dorobku dydaktycznego, współpracy z organizacjami, instytucjami i towarzystwami naukowymi oraz działalności popularyzującej naukę

Habilitant od początku rozwoju naukowego był aktywnym uczestnikiem grantów, już przed uzyskaniem stopnia doktora uczestniczył w 3 projektach naukowych ; w 2 jako kierownik projektu, a 1 jako wykonawca.

Habilitant po uzyskaniu stopnia doktora był kierownikiem 2 projektów naukowych, w tym jednego ze źródeł zewnętrznych – projekt NCN, dotyczący roli pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w transporcie RNA – zakończony w lutym 2020. Habilitant był także wykonawcą w 9 projektach naukowych, w większości były to projekty NCN, w tym w 4 projektach będących w momencie składania dokumentów w realizacji.

Dr Marcin Surmiak był wykonawcą w 1 projekcie międzynarodowym, a obecnie jest wykonawcą w kolejnym projekcie międzynarodowym, związanym z 3 obszarem naukowych zainteresowań; współpracuje także z sektorem gospodarczym w tych projektach.

Tak duże zaangażowanie w projekty badawcze jest dobrym wskaźnikiem rozwoju naukowego i rokuje dalszy rozwój kariery naukowej.

Dr Marcin Surmiak brał aktywny udział w 17 konferencjach zagranicznych i 2 krajowych,

Kandydat jest członkiem 2 towarzystw naukowych.

Kandydat prowadził krótko zajęcia dydaktyczne według klasycznej definicji zajęć uniwersyteckich, tzn. zajęć ze studentami (3 lata z przedmiotu Genetyka dla studentów Wydziału

Lekarskiego), ale uczestniczył aktywnie w przygotowaniu i przeprowadzaniu egzaminów z przedmiotu Fizjologia dla studentów Wydziału Lekarskiego, oraz w zaliczeniu praktycznym z przedmiotu Chemia kliniczna dla studentów kierunku analityka medyczna Wydziału Farmacji CM UJ w Krakowie. Stosunkowo małe zaangażowanie w dydaktykę wynikało prawdopodobnie ze stanowiska na którym Kandydat był zatrudniony (do roku 2020 na stanowisku naukowo-technicznym). Mam nadzieję, że awans na stanowisko adiunkta w kwietniu 2020 pozwoli Kandydatowi na powiększenie dorobku dydaktycznego.

Dr Marcin Surmiak odbył 4 krótkoterminowe staże w ośrodkach zagranicznych, w National Health Institute Doutoe Ricardo Jorge, w Lizbonie; Center for Immunology and Inflammation, Monash University, Clayton, w Australii; Yale School of Medicine, w USA oraz Institute of Pharmacology, University of Bern, Berno, w Szwajcarii. Staże te zostały dobrze wykorzystane i zaowocowały rozwojem metodyki i zainteresowań badawczych. Konsekwencją większości z tych staży są wspólne prace z zespołami zagranicznymi. Świadczy to o dużym potencjale mobilności i umiejętności współpracy z wieloma naukowcami.

Dr Marcin Surmiak wielokrotnie recenzował manuskrypty do kilku międzynarodowych czasopism naukowych.

Podsumowując tę część dorobku – bardzo dobry dorobek o charakterze współpracy z instytucjami naukowymi i czasopismami, bardzo dobre zaangażowanie w projekty naukowe, nieco mniejszy udział w dydaktyce.

Podsumowanie końcowe

Cykl 4 prac zgłoszonych jako osiągnięcie habilitacyjne – prace oryginalne, z większościowym udziałem Kandydata, wykonane metodycznie starannie, z zastosowaniem licznych technik laboratoryjnych opisujące nowo odkryte mechanizmy aktywacji neutrofilów u pacjentów z rzadką chorobą ziarniniakowatości z zapaleniem naczyń (GPA) jest logicznym i konsekwentnym dziełem spełniającym kryteria ustawy odnośnie prac habilitacyjnych. Cykl 4 prac powiązanych tematycznie stanowi istotny wkład Autora w rozwój badań nad patogenezą GPA.

Dorobek naukowy dr Marcina Surmiaka poza osiągnięciem habilitacyjnym uważam za bardzo dobry, spełniający kryteria znaczącej aktywności naukowej do uzyskania stopnia naukowego doktora habilitowanego.

Bardzo dobry dorobek o charakterze współpracy z instytucjami naukowymi i czasopismami, bardzo dobre zaangażowanie w projekty naukowe, nieco mniejszy udział w dydaktyce.

Podsumowując **całość przedstawionych dokumentów stwierdzam, że Kandydat spełnia kryteria do uzyskania stopnia naukowego doktora habilitowanego** według art. 219 ust 1 pkt 2 i 3 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 ze zm).

W związku z tym wnioskuję do Rady Dyscyplin Nauk Medycznych Uniwersytetu Jagiellońskiego, Collegium Biomedicum o dopuszczenie dr Marcina Surmiaka do dalszych etapów przewodu habilitacyjnego.

Prof. dr hab. Ewa Bryl