

Zielona Góra dn. 01 sierpnia 2023 r.

Prof. dr hab. Agnieszka Zembroń-Łacny
Katedra Fizjologii Stosowanej i Klinicznej
Collegium Medicum Uniwersytet Zielonogórski
ul. Zyty 28, 65-046 Zielona Góra
a.zembron-lacny@cm.uz.zgora.pl

RECENZJA

w postępowaniu habilitacyjnym pana doktora nauk medycznych w dyscyplinie biologia medyczna Tomasza Misztal, ubiegającego się o stopień naukowy doktora habilitowanego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.

Recenzję przygotowano w odpowiedzi na uchwałę Senatu z dnia 30 maja 2023r. Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Przedstawiony do oceny komplet dokumentów odpowiada ustawowym wymogom postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora habilitowanego, a ocenę całościowego dorobku Kandydata oparto na art. 219. Warunki nadania stopnia doktora habilitowanego Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).

1. Przebieg pracy zawodowej

Pan dr Tomasz Misztal ukończył studia na Uniwersytecie Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, uzyskując w 2009 roku tytuł magistra biologii w specjalizacji biochemia. W 2009 roku rozpoczął pracę w Zakładzie Chemii Fizycznej Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku – jako asystent naukowo-dydaktyczny. Pięć lat później uzyskał stopień doktora nauk medycznych w dyscyplinie biologia medyczna; Decyzja Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Tematem rozprawy doktorskiej był „Wpływ reaktywnych form azotu na proces retrakcji skrzepu i fibrynolizę”; Promotor prof. dr hab. Marian Tomasiak. Do dnia dzisiejszego dr n. med. Tomasz Misztal jest związany zawodowo z Zakładem Chemii Fizycznej Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, pracując na etacie adiunkta w grupie badawczo-dydaktycznej.

2. Ocena osiągnięcia naukowego będącego podstawą postępowania habilitacyjnego

Habilitant zgodnie z wymaganiami art. 219 ut. 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.), jako osiągnięcie naukowe przedstawił monotematyczny cykl czterech prac pt. „Reaktywne produkty stanu zapalnego – kwas chlorowy (I) i nadtlenoazotyn – jako modulatory hemostazy. Badania nad mechanizmem oddziaływania i kontrolą efektu”, omówiony w sposób uporządkowany w załączonym Autoreferacie. Cykl obejmuje prace powstałe w latach

2014–2022, opublikowane w międzynarodowych wydawnictwach, takich jak *Free Radical Research* 2014 (IF 2,975), *Free Radical Biology and Medicine* 2015 (IF 5,784), *Free Radical Biology and Medicine* 2019 (IF 6,170) i *Antioxidants* 2022 (IF 7,675), co przełożyło się na sumaryczny współczynnik oddziaływania IF prezentowanego osiągnięcia naukowego równy 22,605 (w roku publikacji). Pan dr n. med. Tomasz Misztal przedstawił wymagane ustawowo oświadczenia od czternastu współautorów - co do zakresu prowadzonych prac.

W ramach przedstawionego cyklu publikacji z zakresu biochemii i fizjologii płytek krwi, dr Tomasz Misztal dokonuje: 1) oceny wpływu reaktywnych produktów stanu zapalnego (HOCl i ONOO⁻) na podstawowe odpowiedzi płytek krwi, takie jak adhezja, sekrecja, agregacja i odpowiedź prokoagulacyjna, 2) pomiarów kinetyki formowania skrzepów fibrynowych i fibrynowo-płytkowych w obecności HOCl i ONOO⁻ oraz ich wpływu na proces fibrynolizy, 3) analizy oddziaływania HOCl i ONOO⁻ na kinetykę retrakcji skrzepu w różnych układach doświadczalnych – krew pełna, osocze bogatopłytkowe i układ rekonstruowany zawierający wyizolowane płytki krwi i fibrynogen, 4) wyjaśnienia komórkowego mechanizmu hamowania retrakcji przez HOCl, obejmującego polimeryzację aktyny, generowanie sygnału wapniowego w płytkach krwi, bioenergetykę płytek krwi, aktywację płytkowych receptorów wiążących fibrynogen oraz regulację fibrynolizy przez HOCl i ONOO⁻ z uwzględnieniem wpływu na aktywność czynników fibrynolitycznych, zmian architektury skrzepów fibrynowych i fibrynowo-płytkowych, 5) oceny efektywności polifenoli pochodzenia roślinnego w ochronie przed szkodliwym wpływem HOCl na hemostazę [Misztal T et al. *Free Radical Research* 2014, *Free Radical Biology and Medicine* 2015, *Free Radical Biology and Medicine* 2019, *Antioxidants* 2022].

W pierwszej publikacji Misztal T et al. [*Free Radical Research* 2014] składającej się na rozprawę habilitacyjną wykazano, że HOCl hamuje - w sposób zależny od stężenia - szybkość retrakcji skrzepu we krwi pełnej (stężenie progowe 100 μM), w osoczu bogatopłytkowym (stężenie progowe 50 μM) i w układzie rekonstruowanym zawierającym płukane płytki krwi i fibrynogen (stężenie progowe 25 nM), niespecyficznie ujawniając swoje właściwości utleniające. Prawdopodobny mechanizm hamowania retrakcji przez HOCl obejmuje bioenergetykę płytek krwi, na co wskazuje spadek zawartości ATP i wzrost wytwarzania mleczanu wraz ze wzrostem stężenia HOCl. Wykazano, że HOCl nie wpływa na inne mechanizmy regulujące retrakcję, jak polimeryzacja aktyny w cytoplazmie płytek krwi, generowanie sygnału wapniowego w płytkach krwi czy wiązanie fibrynogeny do płytkowych receptorów GPIIb/IIIa. Na podstawie przeprowadzonych pomiarów w układzie *in vitro*, Misztal T. et al. [*Free Radical Research* 2014] wnioskują, że generacja HOCl w przewlekłej odpowiedzi zapalnej istotnie hamuje retrakcję skrzepu, tym samym może zwiększyć ryzyko zakrzepowo-zatorowe u pacjentów.

W drugiej publikacji Misztal T et al. [*Free Radical Biology and Medicine* 2015], będącej kontynuacją badań podjętych przed uzyskaniem stopnia doktora [Misztal T et al. *Thrombosis Research* 2013, *Thrombosis Research* 2013] - potwierdzono, że jednoczesna generacja ONOO⁻ w odpowiedzi zapalnej spowalnia retrakcję skrzepu we krwi pełnej przy niższych wartościach progowych obu reaktywnych produktów zapalenia HOCl i ONOO⁻. Zahamowanie retrakcji skrzepu przez ONOO⁻ koresponduje z nasileniem fibrynolizy (w obecności płytek

krwi) przy zakresie stężeń 10-300 μM . Zwiększenie szybkości fibrynolizy przez ONOO- może być związane z osłabieniem odpowiedzi prokoagulacyjnej płytek krwi spowodowanej ekspresją fosfatydyloseryny i zahamowaniem sekrecji płytkowych inhibitorów fibrynolizy. Autorzy wnioskują, że generacja ONOO- w przewlekłym zapaleniu promuje fibrynolizę poprzez redukcję „oporności na fibrynolizę zależną od płytek krwi”, co zwiększa ryzyko przedwczesnego rozpuszczenia skrzepu i krwawienia przy jednoczesnym odsłonięciu trombogenicnej powierzchni uszkodzonego naczynia.

W trzeciej publikacji Misztal T et al. [Free Radical Biology and Medicine 2019] podjęli próbę oceny we krwi ludzkiej wpływu fizjologicznych (mikromolarnych) stężeń HOCl na poszczególne etapy hemostazy tj. tworzenie agregatów płytkowych w warunkach przepływu, tworzenie skrzepów fibrynowo-płytkowych, retrakcję skrzepu i fibrynolizę oraz architekturę skrzepów. Wykazano, że HOCl w zakresie wysokich stężeń 500-1000 μM (prawdopodobne *in vivo*) hamuje tworzenie agregatów płytkowych na powierzchniach pokrytych kolagenem w warunkach przepływu, ale nie hamuje tworzenia skrzepów fibrynowo-płytkowych. Potwierdzono wpływ HOCl na szybkość retrakcji skrzepu i fibrynolizy. Istotnie statystycznie hamowanie retrakcji obserwowano już przy stężeniu 50 μM HOCl i fibrynolizy przy stężeniu 125 μM HOCl. Zahamowanie fibrynolizy było porównywalne we krwi pełnej i osoczu pozbawionym płytek krwi. Obserwacje w mikroskopie konfokalnym ujawniły, że obecność HOCl – w stężeniach korespondujących z tymi, które hamowały lizę skrzepu – powoduje formowanie sieci fibryny o gęściej upakowanych włóknach. Oznacza to, że HOCl inicjuje zmiany architektury sieci fibryny w kierunku struktury bardziej odpornej na lizę.

Wyniki badań opublikowane przez Misztal T et al. Free Radical Research 2014, Free Radical Biology and Medicine 2015, Free Radical Biology and Medicine 2019 – jasno wskazują, że retrakcja skrzepu jest etapem hemostazy najbardziej podatnym na hamowanie przez reaktywne formy chloru i azotu (HOCl i ONOO⁻) generowane *in vivo* w wysokich stężeniach w przewlekłym zapaleniu.

Cykl habilitacyjny doskonale zamyka czwarta – ostatnia – publikacja Misztal T et al. [Antioxidants 2022], w której oceniono homeostatyczną aktywność polifenoli pochodzenia roślinnego tj. kwercetyny, gallusanu epigallokatechiny i resweratrolu – wykazujących dobrze udokumentowane działanie antyoksydacyjne i przeciwzapalne. Wykazano, że kwercetyna i gallusan epigallokatechiny (w zakresie stężeń 5-25 μM) skutecznie zapobiega zaburzeniom fibrynolizy i zmianami architektury skrzepów fibrynowych inicjowanych przez HOCl w osoczu pozbawionym płytek krwi. Resweratrol (w stężeniu ≥ 10 μM) hamuje aktywność HOCl w osoczu ubogopłytkowym, natomiast w obecności płytek krwi (krew pełna lub osocze bogatopłytkowe) wykazuje działanie przeciwstawne tzn. nasila działanie HOCl. Zdecydowanie zgadzam się z Autorami nt. użyteczności terapeutycznej polifenoli roślinnych w normalizacji zaburzeń hemostazy obserwowanych podczas stanów zapalnych, którym towarzyszy produkcja wysokich stężeń reaktywnych form chloru i azotu. Jednak należy pamiętać, że naturalne flawonoidy nie mają wystarczającej biodostępności, rozpuszczalności, stabilności, lipofilowości i skuteczności oddziaływania na tkanki, stąd próby poszukiwania pochodnych polifenoli czy syntetycznych polifenoli wykazujących wyższą biodostępność i bioaktywność. W przypadku funkcji płytek

krwi i zakrzepicy, kilka badań poświęcono takim związkom, jak glukozyd kwercetyny, penta-metylokwercecytyna, nobiletyna, chryzyna i tangeretyna opisanych m.in. przez Vallance TM et al. [Int J Med. Sci 2019 doi: [10.3390/ijms20123106](https://doi.org/10.3390/ijms20123106)] i Vazhappilly CG et al. [Inflammopharmacology 2019 doi: [10.1007/s10787-019-00612-6](https://doi.org/10.1007/s10787-019-00612-6)].

Badania w ramach przedstawionego cyklu publikacji zostały zaplanowane i przeprowadzone w sposób prawidłowy z wykorzystaniem wielu zaawansowanych metod i technik badawczych, jak 1) *flow chamber*, cytometria przepływowa, luminometria, *western blot*, cyfrowa rejestracja zmian objętości skrzepu - w analizie odpowiedzi płytek krwi, 2) turbidometria – w analizie kinetyki procesu krzepnięcia, 3) fluorescencja, mikroskopia konfokalna i turbidometria – w ocenie fibrynolizy i architektury skrzepu, i in. Na szczególną uwagę zasługuje implementacja i optymalizacja – w Zakładzie Chemii Fizycznej – techniki *flow chamber* formowania agregatów płytkowych na powierzchni trombogenicnej, z którą pan dr n. med. Tomasz Misztal zapoznał się podczas stażu naukowego na Uniwersytecie w Maastricht w zespole prof. Johana WM Heemskerka.

W autoreferacie wyjaśniono unikatowość wprowadzonej i zmodyfikowanej techniki *flow chamber*, która umożliwia symulację warunków reologicznych występujące w naczyniach krwionośnych, a w powiązaniu z wysokorozdzielczą mikroskopią konfokalną pozwala na ocenę wszystkich etapów formowania czopu płytkowego (adhezja, sekrecja, agregacja) w warunkach bliskich fizjologicznym i rejestrowanie wytwarzania fibryny na powierzchni aktywowanych płytek krwi, wiązanie czynników fibrynolitycznych i stopniową fibrynolizę.

Podjęty przez dr n. med. Tomasza Misztal temat badawczy jest istotny dla zrozumienia biochemii i fizjologii płytek krwi, a dobrze ustawiony i zrealizowany eksperyment wyjaśnia rolę reaktywnych form chloru i azotu w zaburzeniu hemostazy [Misztal T et al. Free Radical Research 2014, Free Radical Biology and Medicine 2015, Free Radical Biology and Medicine 2019] obserwowanej m.in. u pacjentów z niewydolnością oddechową [Tomasik-Lozowska MM, Misztal T et al. Allergy 2017, Tomasik-Lozowska MM, Rusak T, Misztal T et al. Journal of Asthma 2016]. Znajomość mechanizmów oddziaływania reaktywnych form chloru i azotu na funkcje płytek krwi pozwala na redukcję zagrożenia zakrzepowo-zatorowego poprzez zastosowanie właściwej profilaktyki m.in. zmianę w profilu odżywiania i zwiększenie spożycia produktów o wysokiej koncentracji polifenoli [Misztal T et al. Antioxidants 2022]. **Przeprowadzone badania w połączeniu z wysoką wartością punktową publikacji wchodzących w skład rozprawy habilitacyjnej pozwala na wystawienie pozytywnej oceny osiągnięciu naukowemu Kandydata.**

3. Ocena aktywności naukowej

Całkowity dorobek naukowy pana dr n. med. Tomasza Misztal, wg analizy naukometrycznej wykonanej przez Bibliotekę Główną Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, na dzień złożenia dokumentów o wszczęcie postępowania habilitacyjnego obejmuje: 27 prac naukowych o łącznej punktacji IF 88,401, co odpowiada 1520 punktom MNiSW/MEiN. Dorobek habilitacyjny zgłoszony przez Kandydata jako osiągnięcie naukowe

obejmuje cykl 4 publikacji o współczynniku oddziaływania 22,605 i sumarycznej wartości punktów MNiSW/MEiN 450. Liczba cytowań prac z udziałem dr n. med. Tomasza Misztal wg Web of Science wynosi 257, współczynnik Hirscha 11 (wejście 02.11.2022).

Po uzyskaniu stopnia doktora, w latach 2015-2022, pełnił rolę kierownika siedmiu projektów i współwykonawcy w dwudziestu trzech projektach finansowanych przez Uniwersytet Medyczny w Białymstoku ze środków statutowych oraz rolę kierownika projektu pt. „Akwaporyny – nowy potencjalny punkt uchwytu dla leków przeciwpłytkowych” finansowanego w ramach programu Miniatura 1 Narodowego Centrum Nauki (2017/01/X/NZ3/00338) i wykonawcy w projekcie pt. „Przeciwzakrzepowe, hemodynamiczne i oksydacyjno-redukcyjne właściwości nowych donorów HNO” finansowanym w ramach programu Opus 22 Narodowego centrum Nauki (2021/43/B/NZ7/01903, kierownik projektu dr hab. Karol Kramkowski). W 2015 roku, pan dr n. med. Tomasz Misztal odbył dwumiesięczny staż naukowy na Uniwersytecie w Maastricht (Faculty of Health, Medicine and Life Science) uczestnicząc w realizacji projektu zespołu prof. Johana WM Heemskerka (Department of Biochemistry) i przygotowaniu publikacji Baaten CCFMJ et al. [Blood Adv 2018]. Od 2018 roku, pan Doktor podejmuje współpracę z wieloma zespołami na Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku, Uniwersytecie Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie i Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu oraz Instytucie Biochemii Palladina Ukraińskiej Akademii Nauk w Kijowie; w każdym przypadku współpraca naukowa zwieńczona publikacjami. Pan dr n. med. Tomasz Misztal prezentował wyniki badań na 32 krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych. Wykonał recenzje dla 8 czasopism - Antioxidants, Diagnostics, International Journal of Molecular Sciences, Biomedicines, Frontiers in Cardiovascular Medicine, Frontiers in Pharmacology, Platelets, Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Research. Od 2019 roku, pan dr n. med. Tomasz Misztal jest członkiem Society for Redox Biology and Medicine. Kandydat, już w początkowym okresie swojego rozwoju zawodowego miał możliwość pracy pod opieką znakomitych naukowców, co przełożyło się nie tylko na dorobek badawczy, ale także dalszą drogę Jego rozwoju naukowego. Pod kierunkiem Pana prof. dr hab. Mariana Tomasiak rozwijał swoje zainteresowania badawcze w obszarze biochemii i fizjologii płytek krwi

Podsumowując, dorobek naukowy dr n. med. Tomasza Misztal jest wystarczająco obszerny. Stosunkowo duża ilość publikacji rejestrowanych w JCR (21 pozycji), poza przedstawionym do habilitacji cyklem 4 prac, nie budzi zastrzeżenia dot. poziomu aktywności publikacyjnej o zasięgu międzynarodowym. Prace ukazywały się regularnie, co wskazuje na stabilny rozwój kariery naukowej Kandydata. Znaczący udział publikacji (9 pozycji), w których dr n. med. Tomasz Misztal jest pierwszym autorem pozwala stwierdzić, że Kandydat osiągnął poziom samodzielności naukowej.

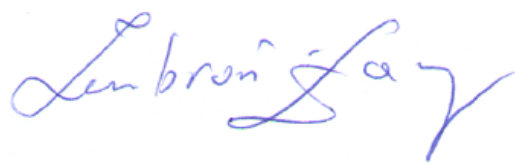
4. Ocena działalności dydaktycznej i organizatorskiej Kandydata

Pan dr Tomasz Misztal jest doświadczonym dydaktykiem. W trakcie swojej pracy prowadził wykłady, ćwiczenia i/lub seminaria z przedmiotów, takich jak biofizyka, chemia fizyczna, mechanizmy przekazywania

sygnału w komórkach, postępy w technikach badawczych oceniających właściwości powstającego skrzepu - dla studentów kierunków prowadzonych na Wydziale Farmacji z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Był promotorem 13 prac magisterskich - na kierunku farmacja, oraz promotorem pomocniczym w przewodzie doktorskim mgr Agaty Gołaszewskiej pt. „Ocena wpływu adrenaliny na aktywność płytek krwi zdrowych ochotników” (obrona rozprawy doktorskiej 2021r.). Aktywność dydaktyczna Kandydata obejmuje także opiekę naukową stypendystki Federation of European Biochemical Societies - Olgi Revki (doktorantka w Instytucie Biochemii Ukraińskiej Akademii Nauk z Kijowie) podczas pobytu na Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku. Pan dr n. med. Tomasz Misztal od 2016 roku jest członkiem Wydziałowego Zespołu do Spraw Zapewnienia i Doskonalenia Jakości Kształcenia na kierunku farmacja - Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

5. Wniosek końcowy

Na podstawie oceny przedstawionego, jako osiągnięcie naukowe, cyklu prac oraz całości aktywności dorobku naukowego stwierdzam, że pan doktor nauk medycznych Tomasz Misztal spełnia wymogi określone w art. 219 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.) w sprawie kryteriów oceny osiągnięć osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora habilitowanego, **wniosuję do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie dr n. med. Tomasza Misztal do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora habilitowanego w dziedzinie nauki medyczne i nauki o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.**



.....
Prof. dr hab. Agnieszka Zembroń-Łacny