

Warszawa 20 07 2022

Prof. dr hab. med. Urszula Demkow

Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej i Immunologii Klinicznej Wieku Rozwojowego

Warszawski Uniwersytet Medyczny

Ocena osiągnięcia naukowego oraz działalności naukowej i dydaktycznej dr n. med. Marzeny Garley, kandydatki do stopnia doktora habilitowanego nauk medycznych

1. Uwagi formalne

Recenzję niniejszą wykonałam w związku powołaniem mnie w skład komisji habilitacyjnej przez Senat Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Oceny dokonałam według obowiązujących uregulowań prawnych, biorąc pod uwagę przede wszystkim dorobek naukowy i wkład Kandydatki w rozwój uprawianej dyscypliny naukowej oraz możliwość samodzielnego prowadzenia badań naukowych.

Podstawą oceny był zbiór opublikowanych artykułów stanowiących rozprawę habilitacyjną, zestaw załączonych dokumentów, w tym omówienie najważniejszych osiągnięć naukowych i tematyki badawczej oraz zwięzłe przedstawienie badań opublikowanych w pracach wchodzących w skład rozprawy habilitacyjnej, a także zestawienie działalności dydaktycznej, wykaz nagród i innych wyróżnień oraz udział w projektach badawczych.

Przesłany mi materiał dokumentacyjny zawiera autoreferat Pani dr n. med. Marzena Garley omawiający zakres badań i dorobek naukowy Habilitantki, spis publikacji z podanym sumarycznym współczynnikiem oddziaływania publikacji naukowych według listy JCR, liczbę cytowań publikacji według bazy Web of Science z podaniem indeksu Hirscha oraz dodatkowe informacje.

2. Ocena osiągnięcia naukowego pt.: „Znaczenie zmian w formowaniu zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych (NETs) i polaryzacji neutrofilów w przebiegu raka płaskonabłonkowego jamy ustnej”.

Na rozprawę habilitacyjną składa się 5 oryginalnych publikacji i 2 prace poglądowe. Wszystkie publikacje są pracami o autorstwie zespołowym. We wszystkich pracach Habilitantka jest pierwszym autorem. Wszystkie prace publikowane są w renomowanych międzynarodowych czasopismach posiadających impact factor. Łączny IF cyklu prac wynosi **21.204**; MNiSzW – **710**.

Neutrofile stanowią pierwszą linię obrony organizmu przed patogenami wykorzystując proces fagocytozy, degranulację ziarnistości oraz generując powstawanie wolnych rodników tlenowych. Stosunkowo niedawno odkryty został nowy sposób walki z drobnoustrojami, zależny od powstawania zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych (NETs). Sieci utworzone z jądrowego lub mitochondrialnego materiału genetycznego, w tym kwasów nukleinowych i histonów, oraz enzymów zawartych w ziarnistościach granulocytów. NETs posiadają zdolność do wychwytu i zabijania patogenów, a zjawisko to stanowi istotny mechanizm obronny w ciężkich zakażeniach. W ostatnich opublikowano wiele doniesień wskazujących na udział NETs w patogenezie różnych chorób o podłożu immunologicznych oraz w nowotworach.

Głównym celem przeprowadzonych przez Habilitantkę badań składających się na osiągnięcie naukowe jest ocena tworzenia zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych (NETs) oraz polaryzacji neutrofilów u chorych na raka płaskonabłonkowego jamy ustnej.

Pierwsza praca zaliczona do cyklu tworzącego osiągnięcie naukowe (**Garley Marzena***, **Jabłońska Ewa, Dąbrowska Dorota. NETs in cancer. Tumor Biology 2016: 37, 11, s. 14355-14361**). Jest pracą przeglądową podsumowującą wiedzę dostępną do 2016 roku na temat zależności pomiędzy rozwojem nowotworu a subpopulacjami neutrofilów TAN1 i TAN2 oraz roli NETs w procesie rozwoju guza nowotworowego. W przeglądzie dyskutowane są znane zależności pomiędzy komórkami guza nowotworowego a NETs oraz opisana jest zakrzepica indukowana NETs w przebiegu nowotworów.

Kolejno praca: **Garley Marzena*, Jabłońska Ewa, Surażyński Arkadiusz, Grubczak Kamil, Ratajczak-Wrona Wioletta, Iwaniuk Agnieszka, Dąbrowska Dorota, Pałka Jerzy Aleksander, Moniuszko Marcin. Cytokine network & NETs. Folia Biologica (Praha) 2017: 63, 5-6, s. 182-189** jest publikacją oryginalną. Celem pracy było opracowanie własnej metody mikroskopowej oceniającej proces formowania zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych. Habilitantka zastosowała sortowanie neutrofilów w polu magnetycznym z wykorzystaniem kulek paramagnetycznych opłaszczonych przeciwciałami oraz ustaliła parametry techniczne w systemie mikroskopowym BD Pathway 855 umożliwiającym wykonanie zdjęć struktur NETs. W opisie metodologii brakuje jednak istotnych informacji tj w jaki sposób barwiony i przygotowywany był preparat (czy stosowano permabilizację, jak i czy utrwalano preparat), nie przedstawiono również kryteriów kwalifikacji obiektu jako neutrofil sieciujący czy też ulegający nekrozie czy innego rodzaju śmierci komórki. Nie odniesiono się również

do innych prac opisujących standardy oceny mikroskopowej sieci. Habilitantka opisuje istnienie dwóch populacji neutrofilów o różnej ekspresji MPO (niskiej - MPOlow i wysokiej - MPOhigh). Autorka wiąże ekspresja mieloperoksydazy w stymulowanych komórkach z procesem NETozy. Nie udowodniono jednak jaka jest przyczyna niskiej lub wysokiej ekspresji MPO i czy słusznie wiąże się tę obserwację z tworzeniem NETs. Kolejno Habilitantka oceniła wpływ wybranych cytokin na proces uwalniania sieci. Nie przedstawiono wyników liczbowych na podstawie, których Habilitantka wnioskuje, że badane cytokiny stymulują wyrzut sieci. Stężenie wolnego DNA w surowicy zależy nie tylko od tworzenia sieci ale również innych procesów związanych ze śmiercią komórki. Brakuje dyskusji tej obserwacji. Autorka opisuje również różnice w budowie NETs w zależności od zastosowanej cytokiny, brakuje jednak zdjęć obrazujących tę obserwację.

Kolejna praca: **Garley Marzena*, Dziemiańczyk-Pakiela Dorota, Grubczak Kamil, Surażyński Arkadiusz, Dąbrowska Dorota, Ratajczak-Wrona Wioletta, Sawicka-Powierza Jolanta, Borys Jan, Moniuszko Marcin, Pałka Jerzy, Jabłońska Ewa. Differences and similarities in the phenomenon of NETs formation in oral inflammation and in oral squamous cell carcinoma. Journal of Cancer 2018: 9, s. 1958-1965** opisuje wzrost wyrzutu NETs u 10 chorych z zapaleniem w obrębie jamy ustnej w stosunku do osób zdrowych. Nie przedstawiono jednak kryteriów włączenia do tej grupy czyli rodzaju i nasilenia zmiany w jamie ustnej uznanej za zapalenie. W tej grupie obserwowano wzrost liczby neutrofilów MPO+ (dodatnich), przeciwnie do grupy chorych na nowotwór jamy ustnej. W grupie chorych z zapaleniem jamy ustnej zaobserwowano również wzrost wolnego DNA w surowicy lub supernatancie PMN. Nie jest to jednak jednoznaczne z wnioskiem, że pochodzi on z sieci neutrofilowych. Obserwowano obniżenie liczby neutrofilów MPO+ po stymulacji LPS zarówno u pacjentów z zapaleniem, jak i u chorych na raka. Autorka tłumaczy tę obserwację utratą komórek MPO+ z powodu formowania NETs. Zaobserwowano również odwrotną zależność pomiędzy ilością cfDNA w supernatantach PMNs a neutrofilami MPO+ po stymulacji LPS. Zastanawiająca jest odwrotna zależność pomiędzy odsetkiem neutrofilów tworzących sieci a wolnym DNA.

Następną pracą zaliczoną do cyklu jest publikacja: **Garley Marzena*, Jabłońska Ewa, Miltyk Wojciech, Grubczak Kamil, Surażyński Arkadiusz, Ratajczak-Wrona Wioletta, Grudzińska Małgorzata, Nowacka Kinga, Moniuszko Marcin, Pałka Jerzy, Borys Jan, Dziemiańczyk-Pakiela Dorota. Cancers cells in traps? The pathways of NETs formation in response to OSCC in humans - a pilot study. Cancer Control 2020: 27, 1, 10 pp.** Jest to badanie wstępne oceniające proces formowania NETs przez neutrofile chorych na raka płaskonabłonkowej błony śluzowej jamy ustnej w odpowiedzi na pośredni lub bezpośredni kontakt z komórkami linii raka płaskonabłonkowego. Obserwowano wzrost uwalniania NETs przez neutrofile NETs po kohodowli z komórkami nowotworowymi, a także po stymulacji supernatantem z hodowli SCC. Podwyższonym parametrem wskazującym na spontaniczne uwolnieniem NETs przez niestymulowane neutrofile pacjentów towarzyszyła wysoka ekspresja białek p-Akt (T308), p-Akt (S473) oraz p-PI 3k, Nasilenie formowania

NETs obserwowano też w odpowiedzi na bezpośredni kontakt z komórkami nowotworowymi linii SCC z towarzyszącymi zmianami ekspresji p-Akt po krótkiej kohodowli z komórkami SCC, wskazując na aktywację szlaku Akt/PKB w neutrofilach w odpowiedzi na komórki nowotworowe. Obserwowano również niską ekspresję p-PI 3k. Wzrost stężenia cfDNA oraz MPO po stymulacji neutrofilów chorych na raka supernatantem uzyskanym z hodowli SCC korelował obserwacjami mikroskopowymi i świadczył o stymulacji produkcji NETs pod wpływem nieznanymi czynników produkowanych przez komórki nowotworowe.

W pracy **Garley Marzena***, **Dziemiańczyk-Pakiela Dorota**, **Ratajczak-Wrona Wioletta**, **Przybycisz Anna**, **Nowak Karolina**, **Łazarczyk Bogdan**, **Jabłońska Ewa**. **NETs biomarkers in saliva and serum OSCC patients: one hypothesis, two conclusions. Advances in Medical Sciences 2022:67(1), s. 45-54** habilitantka oceniła ekspresję wybranych biomarkerów NETs w różnym materiale biologicznym: w tkance guza, neutrofilach, ślinie oraz surowicy. Wyciągnięcie wniosków z wykorzystanych w pracy obrazów histologicznych jest trudne gdyż nie zastosowano wielokolorowego barwienia kilku biomarkerów w jednym preparacie. Tego typu barwienie pozwoliłoby najlepiej potwierdzić czy MPO i histony tworzą wspólna strukturę czy też są niezależnymi elementami. Oceniono również aktywność oksydazy NADPH w oparciu o ekspresję poszczególnych podjednostek oraz izoform oksydazy. Jednocześnie oceniono możliwość wykorzystania śliny jako materiału diagnostycznego do oceny markerów NETs oraz DNAzy.

Praca poglądowa **Garley Marzena***, **Jabłońska Ewa**. **Heterogeneity among neutrophils. Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis 2018: 66, 1, s. 21-30** to przegląd dostępnej literatury w zakresie heterogenności neutrofilów w przebiegu choroby nowotworowej.

Publikacja **Garley Marzena***, **Jabłońska Ewa**, **Dziemiańczyk-Pakiela Dorota**, **Miltyk Wojciech**, **Ratajczak-Wrona Wioletta**, **Borys Jan**, **Moniuszko Marcin**, **Grubczak Kamil**. **LDGs versus NDGs in patients with oral squamous cell carcinoma (OSCC). Cytokine 2021: 137, 9** ocenia populacje LDNs (ang. low density neutrophils) oraz NDNs (ang. normal density neutrophils) z uwzględnieniem ekspresji IL-17. Oceniono również wpływ rhIL-17 na proliferację komórek linii nowotworowej SCC. Wykazano wysoki odsetek LDNs u chorych raka płaskonabłonkowego, dodatnią korelację ekspresji IL-17 w LDNs i NDNs oraz brak wpływu rhIL-17 na proliferację komórek linii nowotworowej SCC.

Do najbardziej istotnych osiągnięć Habilitantki zaliczam:

1. Podjęcie ważnego tematu, jakim jest udział sieci neutrofilowych w procesie tworzenia guza nowotworowego.
2. Wykazanie obecności dwóch populacji neutrofilów o odmiennej ekspresji MPO.
3. Potwierdzenie udziału zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych w przebiegu procesu zapalnego.

4. Wykazanie obecności NETs w kohodowli neutrofilów z komórkami SCC, z udziałem kinazy Akt.
5. Obserwację markerów NETs w preparatach tkanki guza. Wykrycie markerów NETs w ślinie i zaobserwowanie różnic pomiędzy chorymi na nowotwór jamy ustnej .

3. Ocena dorobku naukowego i dydaktycznego Habilitantki

3a. Charakterystyka dorobku naukowego

Analiza osiągnięć naukowo-badawczych Habilitantki wykazała, że kandydatka posiada odpowiedni dorobek naukowy. Łącznie jest współautorem 51 prac naukowych, oryginalnych i poglądowych. Sumaryczny IF opublikowanych prac wynosi **116,846**; liczba cytowań (wszystkich prac, łącznie z włączonymi do rozprawy habilitacyjnej, bez autocytowań) wynosi **279**, Indeks Hirscha **11**. Wszystkie prace są publikacjami o autorstwie zespołowym.

Jednym z głównych tematów badawczych to tworzenie NETs w różnych chorobach o podłożu zapalnym i nowotworowym. W dorobku Habilitantki znajdują się też prace oceniające wpływ cytokin na różne funkcje leukocytów i komórek nowotworowych, badania funkcji neutrofilów i przekazywania sygnału w neutrofilach oraz prace związane z produkcją tlenu azotu.

Habilitantka brała udział w realizacji szeregu projektów naukowych finansowanych ze źródeł zewnętrznych. Sama również aplikowała o środki na badania, niestety bez sukcesu, ale docenić należy wysiłek związany z przygotowaniem wniosków.

Kandydatka brała czynny udział w licznych konferencjach naukowych krajowych, była również zapraszana do wykonywania recenzji prac w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowych. Odbyla również staż w ośrodku akademickim w Turcji w ramach programu Erasmus plus.

Za działalność naukową Habilitantka otrzymała liczne nagrody i wyróżnienia, głównie nagrody Rektora Uniwersytetu medycznego w Białymstoku.

3b. Charakterystyka dorobku dydaktyczno-wychowawczego

Habilitantka prowadziła zajęcia i seminaria dla studentów analityki w zakresie immunologii. Sprawowała opiekę naukową nad studenckim kołem naukowym oraz nad praktykami wakacyjnymi studentów. Brała również udział w organizacji konkursów dla studentów kierunku Analityka Medyczna. Za pracę dydaktyczną wyróżniona w konkursie na najlepszego nauczyciela akademickiego. Była również promotorem pomocniczym w przewodzie doktorskim.

4. Wniosek końcowy

Na podstawie szczegółowej analizy rozprawy habilitacyjnej oraz dorobku naukowego, dydaktycznego i zawodowego stwierdzam, że dr n. med. Marzena Garley:

- przedłożyła do oceny osiągnięcie naukowe pt. **„Znaczenie zmian w formowaniu zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych (NETs) i polaryzacji neutrofilów w przebiegu raka płaskonabłonkowego jamy ustnej”**, które stanowi wkład Habilitantki w rozwój nauk medycznych;
- ma udokumentowany, oryginalny dorobek naukowy, który spełnia wymagania stawiane Kandydatom ubiegającym się o stopień naukowy doktora habilitowanego;
- Habilitantka posiada umiejętność podejmowania ważnej tematyki badawczej;
- wygłaszała referaty na konferencjach;
- posiada odpowiedni dorobek dydaktyczny.

W oparciu o przeprowadzoną analizę stwierdzam, że przedstawione do recenzji spójne tematycznie osiągnięcie oraz dorobek naukowy i dydaktyczny Dr n. med. Marzeny Garley spełnia kryteria uprawniające do nadania stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.. Kandydatka jest aktywnym naukowcem, otwartym na nowe obszary badań, pełnym pasji zarówno w prowadzeniu badań naukowych, jak i w pracy z młodzieżą. Jej dorobek naukowy, mimo pewnych uwag merytorycznych, liczba publikacji, w które była i jest zaangażowana, a także dorobek dydaktyczny świadczą o dobrym przygotowaniu Habilitantki do prowadzenia pracy naukowo-badawczej. Jest także, jako przyszły samodzielny pracownik naukowy, przygotowana do pracy dydaktycznej. Tym samym popieram wniosek Dr n. med. Marzeny Garley o nadanie stopnia naukowego doktora habilitowanego nauk medycznych.

Prof. dr hab n. med. Urszula Demkow

