



Warszawa, dn. 10.09.2021

RECENZJA

**rozprawy doktorskiej mgr Angeli Dziedzic
pt. „Molekularne mechanizmy wzmożonej aktywności pro-zakrzepowej płytek
krwi w stwardnieniu rozsianym”**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska pt. „Molekularne mechanizmy wzmożonej aktywności pro-zakrzepowej płytek krwi w stwardnieniu rozsianym” została wykonana w Katedrze Biochemii Ogólnej Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego. Promotorem rozprawy jest prof. dr hab. Joanna Saluk-Bijak.

Rozprawa jest napisana w języku polskim i zawiera wszystkie elementy typowe dla prac doktorskich: wstęp, cel pracy, bogatą oraz szczegółowo opisaną metodykę. Pracę kończy wyczerpująca dyskusja oraz wnioski. Dołączone zostało również streszczenie pracy w języku polskim i angielskim. Wyróżnić należy bogate piśmiennictwo – zacytowano ponad 400 pozycji. Informacja o zgodach Komisji Bioetycznych na przeprowadzenie badań znajduje się na str. 41 (sekcja 3.1- Materiały). Doktorantka nie dołączyła opisu dorobku naukowego. Choć nie jest to wymóg formalny, to należy dzielić się sukcesami, które odnosi się na polu naukowym już na tak wczesnym etapie kariery naukowej. Zgodnie z danymi w systemie ORCID Doktorantka jest współautorką 17 publikacji naukowych opublikowanych w pismach z bazy Journal Citation Reports (JCR) o wysokich wskaźnikach „imapaact factor” i Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Otrzymała i kieruje grantem w ramach konkursu Preludium-17 Narodowego Centrum Nauki. Świadczy to o predyspozycjach oraz ogromnym zaangażowaniu Doktorantki w działalność naukową prowadzoną w ramach Katedry Biochemii Ogólnej Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego kierowanej przez Promotora, Panią prof. Joannę Saluk-Bijak.



Wartość naukowa rozprawy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska obejmuje badania mające na celu lepsze poznanie i zrozumienie patogenezы stwardnienia rozsianego (SM). Sam przedmiot badań jest nie tylko ciekawy od strony naukowej, ale co ważne istotny społecznie. Na SM choruje blisko 4 mln ludzi, a tylko w Polsce ok. 50 tys. Stwardnienie rozsiane należy do chorób autoimmunologicznych. Ta grupa chorób jest wyzwaniem dla klinicystów i naukowców, ponieważ są to tzw. choroby kompleksowe, w patogenezы których kluczową rolę odgrywają czynniki immunologiczne, genetyczne oraz środowiskowe. Dlatego badania nad patomechanizmem chorób autoimmunologicznych, w tym SM, są niezwykle trudne. Najczęściej diagnozowanym typem SM jest postać z rzutami, charakteryzująca się okresami, w których pojawiają się nowe objawy, a po nich następuje względna stabilizacja. Po okresie rzutowym choroba przyjmuje postać wtórnie postępującą. Ten typ SM diagnozowany jest u ~2/3 chorych. Drugi typ - „pierwotnie postępujący”, polega na systematycznie narastającej progresji objawów od początku choroby. O wyjątkowości SM świadczy również to, że dotyka osób względnie młodych. Pierwsze symptomy tej zapalno-degeneracyjnej choroby ośrodkowego układu nerwowego pojawiają się zwykle pomiędzy 20 a 40 rokiem życia. Przyjmuje się, że główną przyczyną uszkodzenia komórek nerwowych jest szeroko pojęta zaburzona odpowiedź immunologiczna. Dlatego podjęte przez Doktorantkę badania nad rolą odpowiedzi immunologicznej, ze szczególnym uwzględnieniem dotąd niejasnej roli aktywności pro-zakrzepowej płytek krwi w indukcji stanu zapalnego i indukcji stresu oksydacyjnego w SM, są nowatorskie i naukowo istotne. Dodatkowo, o trafności wybranej tematyki przewodu świadczyć może obserwowane w ostatnich latach duże zainteresowanie badaniami nad patogenezą SM wykraczającymi poza analizę roli samych leukocytów. Należy zaznaczyć, że przedstawione w rozprawie badania są unikatowe. Pomimo, że rola aktywności pro-zakrzepowej płytek krwi w SM była proponowana, to molekularne mechanizmy tego procesu są nieznane. Wyniki opisane z rozprawie zapewne zostaną opublikowane w renomowanych pismach z listy JCR. Znajduje to już potwierdzenie w opublikowanej w ostatnich miesiącach przez Doktorantkę pracy oryginalnej,



zawierającej część wyników uzyskanych w trakcie przewodu.

Wartość merytoryczna rozprawy

Wartość merytoryczną rozprawy oceniam wysoko. We wstępie, który jest doskonałym wprowadzeniem do tematyki pracy Doktorantka przedstawia wyczerpująco charakterystykę budowy i biologii płytek krwi, i co nie jest łatwe, robi to w bardzo przystępny sposób. Podane informacje są oparte na bogatej literaturze. To samo dotyczy również opisu jednej z głównych technik badawczych użytych przez Doktorantkę w badaniach – cytometrii przepływowowej, czy sekcji omawiającej mikroRNA. Moim zdaniem tak bogaty wstęp może z powodzeniem służyć studentom kierunków biologicznych, czy medycznych jako cenny materiał podsumowujący i poszerzający ich wiedzę w zakresie biologii płytek krwi, jak i technik badawczych.

Cel pracy został sformułowany w sposób jasny i obejmował zbadanie molekularnego podłoża podwyższonej aktywności pro-zakrzepowej płytek krwi występującej u pacjentów z postępującą postacią stwardnienia rozsianego. Wyróżniono 5 celów szczegółowych obejmujących analizę: (i) stanu czynnościowego płytek krwi; (ii) zmian molekularnych fibrynogenu w płytkach krwi i megakariocytach; (iii) zmian białek cytoszkieletu płytek krwi: β -tubuliny i β -aktyny; (iv) profilu ekspresji miRNA w płytkach krwi i megakariocytach oraz (v) funkcjonalności mitochondriów w płytkach krwi. Materiał badawczy stanowiła krew pobrana od pacjentów ze stwierdzoną postępującą postacią stwardnienia rozsianego. Grupę kontrolną stanowili zdrowi ochotnicy. Obie grupy zostały dobrane prawidłowo, zarówno pod względem liczebności, wieku, płci, jak i innych parametrów. Bogata metodologia badań jest opisana wyczerpująco. Doktorantka w badaniach posłużyła się szerokim panelem nowoczesnych technik badawczych i analiz wymagających wysokich umiejętności, pozwalających nie tylko na operowanie samymi urządzeniami, ale i niezbędnych w analizie wygenerowanych danych. Doktorantka w badaniach skorzystała z technik analitycznych i diagnostycznych (tj. cytometria przepływowa, ELISA), jak również z zaawansowanych technik biologii molekularnej (np. RT-qPCR, mikromacierze,



sekwencjonowanie DNA, chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas).

Wyniki przedstawione są w sposób logiczny i czytelny. Przeprowadzona analiza statystyczna danych została wykonana przy użyciu prawidłowo dobranych testów. Doktorantka zastosowała oprogramowanie dedykowane do tego typu analiz (tj. Prism, Statistica), które jednocześnie umożliwia graficzną prezentację analizowanych danych. Wyniki zostały zwalidowane stosując niezależne techniki. Dane są bogato ilustrowane rycinami, wykresami i tabelami, co bardzo ułatwia ich analizę. Opis i interpretacja danych świadczą o tym, że Pani mgr Angela Dziedzic posiada wysokie umiejętności i wiedzę, co potwierdza jej dojrzałość naukową i gotowość do samodzielnego prowadzenia prac badawczych. Wyniki zostały prawidłowo skonfrontowane z dostępnymi danymi literaturowymi i przedyskutowane. Wnioski są poprawnie sformułowane i odnoszą się do wcześniej postawionych celów badawczych oraz uzyskanych wyników.

Doktorantka m. in. wykazała, że: (i) płytki krwi oraz megakariocyty pochodzące z krążenia pacjentów z PMS charakteryzują się wzmożoną ekspresją i reaktywnością wybranych receptorów powierzchniowych, co może wyjaśniać przyczynę pro-zakrzepowego potencjału tych komórek, obserwowanego w PMS; (ii) zwiększone wewnątrzkomórkowe stężenie fibrynogenu w płytkach krwi i megakariocytach w PMS oraz zmiany/polimorfizmy sekwencji DNA mogą przyczyniać się do pro-zakrzepowego charakteru zmian całkowitego potencjału hemostatycznego w PMS; (iii) zmiany molekularne β -tubuliny mogą stanowić bezpośrednią przyczynę zmienionej odpowiedzi hemostatycznej płytek krwi w PMS; (iv) w PMS występują zmiany w poziomie ekspresji wybranych mikroRNA (miR-15b-5p, miR-24-3p, miR-126-5p, miR-199a-3p) zaangażowanych w regulację procesów aktywacji i apoptozy płytek; (v) stres oksydacyjny odgrywa istotną rolę w promowaniu pro-zakrzepowej odpowiedzi płytek krwi.

Poprawność redakcyjna rozprawy

Praca jest napisana poprawnym językiem, z zachowaniem adekwatnej terminologii.



Układ pracy, szatę graficzną jak i styl oceniam wysoko. Błędy edytorskie są nieliczne (tj. „1 pg to 5 µg”). Jedyne warte rozważenia byłoby dodanie rycin we wstępie (gdzie umieszczono tylko jedną rycinę), w celu ułatwienia czytającemu śledzenia kolejnych akapitów. Zaproponowałbym np. rycinę przedstawiającą schemat obrazujący działanie cytometru przepływowego, czy biogenezy miRNA, które dopełniłyby ten wartościowy rozdział.

Uwagi krytyczne

Poniżej przedstawione uwagi i pytania nie wpływają na moją bardzo wysoką ocenę rozprawy. Prosiłbym Doktorantkę o odniesienie się do zawartych poniżej komentarzy i pytań:

1. W sekcji „Materiały i Metody” Doktorantka mogła pominąć część szczegółowych opisów zastosowanych metod ponieważ posługiwała się ogólnodostępnymi zestawami komercyjnymi. Moim zdaniem wystarczające byłoby podanie informacji jaki zestaw zastosowano (nr katalogowy) oraz, że postępowano zgodnie z zaleceniami producenta. Jedyne należałoby poinformować o ewentualnych odstępstwach od protokołu. Również zauważyłem, że część schematów np. Ryc. 2 przypomina schemat pokazany w materiałach producenta zestawu. Jeśli faktycznie użyto tego schematu, w tej sytuacji należało dopisać „zapożyczono/zmodyfikowano z ” i podać źródło.
2. Dlaczego w analizach nie użyto techniki Western blot do walidacji wyników z np. pomiarów ekspresji wybranych genów płytkowych na poziomie białka?
3. Na str. 51 podana jest informacja, że oczyszczone RNA przechowywano w temperaturze -32 °C. Dlaczego nie w bardziej klasycznych temperaturach tj. -20 °C, -25 °C lub -80 °C? Oczywiście wartość ta mieści się w rekomendowanym zakresie, ale czy jest jakiś powód, aby przetrzymywać próbki w tej konkretnej temperaturze?
4. Rozumiem, że nadreprezentacja próbek pobranych od pacjentek odzwierciedla fakt, że SM jest diagnozowane w populacji kobiet 2-krotnie częściej. Z drugiej strony choroba u mężczyzn często ma inny, szybszy przebieg. Czy zdaniem Doktorantki możliwy jest inny patomechanizm SM w zależności od płci i czy powinno się uwzględniać ten fakt np. w doborze badanych grup?



5. Kolejne pytanie dotyczy rozrzutów (wysoka wartość SD) występujących w przypadku niektórych analiz, np. prezentowanych na rycinach 14B, czy 16A. Z czego one mogą wynikać?
6. Czy zdaniem Doktorantki uzyskane dane mają potencjał diagnostyczny? Czy np. dane uzyskane podczas analizy miRNA lub zmiany w stężeniu fibrynogenu w płytkach krwi pobranych od pacjentów mogą służyć jako swoiste biomarkery wczesnego wykrywania SM?

Wniosek końcowy

Stwierdzam, że recenzowana praca doktorska Pani mgr Angeli Dziejic „Molekularne mechanizmy wzmożonej aktywności pro-zakrzepowej płytek krwi w stwardnieniu rozsianym” w pełni spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789). Zwracam się do Wysokiej Komisji UŁ ds. Stopni Naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr Angeli Dziejic do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wniosek o wyróżnienie

Badania przedstawione w rozprawie wpisują się w szerokie zainteresowania badawcze realizowane w kierowanej przez Promotora Katedrze Biochemii Ogólnej Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego. Badania te są ważne zarówno naukowo jak i społecznie, ponieważ pomimo postępu w leczeniu stwardnienia rozsianego, wciąż nie obserwuje się oczekiwanego przełomu, który skutkowałby istotnie wyższym odsetkiem skutecznego hamowania postępów choroby i towarzyszących jej objawów. Rozprawę cechuje ponadprzeciętna jakość. Swoje badania Pani mgr Angela Dziejic oparła na szerokim panelu zaawansowanych technik analitycznych i molekularnych. Uzyskane wyniki stanowią istotny wkład w badania nad rolą płytek krwi w patogenezie stwardnienia rozsianego, ponieważ dostarczają nowych istotnych informacji na temat ich roli w rozwoju tej choroby.



Całościowy, wyróżniający dorobek naukowy Doktorantki w postaci publikacji naukowych o wysokiej liczbie cytowań, uzyskanie finansowania z Narodowego Centrum Nauki oraz fakt, że wyniki rozprawy doktorskiej mogą przyczynić się do zdefiniowania nowych biomarkerów, czy celów terapii ukierunkowanej w SM, argumentują mój wniosek do Wysokiej Komisji UŁ ds. Stopni Naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o wyróżnienie rozprawy doktorskiej przedłożonej przez Panią mgr Angelę Dziedzic.

Damian Gawęł