

14 września 2022 r.

Prof. dr hab. n. med. Paweł Parniewski
Instytut Biologii medycznej PAN

Sz. Pani
Przewodnicząca
Komisji Uniwersytetu Łódzkiego
Do spraw stopni naukowych
W dyscyplinie nauki biologiczne
Prof. dr hab. Agnieszka Marczak

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

zatytułowanej:

„Poszukiwanie w płytkach krwi molekularnych markerów określających predyspozycje człowieka do wystąpienia Ostrego Zespołu Wieńcowych”.

Zaprezentowana praca doktorska ma układ typowy dla tego typu rozpraw w dyscyplinie nauk biologicznych. Rozprawę rozpoczyna **Spis treści** kierujący do poszczególnych elementów niniejszej rozprawy. W drugiej części Autor przedstawił **źródła finansowania prowadzonych przez siebie badań**. Jest to istotna, jeżeli nie najważniejsza część eksperymentalnych badań naukowych. Pan mgr Rafał Szelenberger uzyskał finansowanie Ministerstwa Edukacji i Nauki dla projektu „Diamentowy Grant nt.: Płytkowe mikroRNA jako marker predykcyjny Ostrego Zespołu Wieńcowego”, którego, pod opieką prof. dr hab. Joanny Saluk-Biejak, był kierownikiem. Drugim źródłem finansowania badań, uzyskanym przez Doktoranta była dotacja celowa przyznawana na prowadzenie działalności naukowej i służącej rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich. Zabrakło w tej części, co jest dla recenzenta istotne, informacji o wysokości uzyskanych środków finansowych. Niemniej, **wysoko oceniam** ten etap procesu realizacji rozprawy doktorskiej, pokazujący dojrzałość naukową Doktoranta i umiejętność zdobywania finansowania dla prowadzonych badań.

W kolejnej części Autor rozprawy prezentuje nawiązaną **Współpracę** naukową, konieczną dla realizacji celów badań. Jest to współpraca z Kliniką Kardiologii Interwencyjnej i Elektrokardiologii Centralnego Szpitala Klinicznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, z udziałem dr n. med. Michała Kacprzaka, promotora pomocniczego w ocenianej rozprawie. Drugim ośrodkiem naukowym, z którym współpracował Pan dr Szelenberger był Zakład Farmakologii i Toksykologii Katedry Farmakologii Ogólnej, Klinicznej i Toksykologii UM w Łodzi, gdzie Autor przeprowadził konieczne analizy statystyczne przy pomocy dr n. med. Michała Seweryna Karbownika. Patrząc na zakres i tematykę badań wchodzących w niniejszą rozprawę, dobór naukowych jednostek współpracujących był konieczny i właściwy.

W części czwartej Doktorant przedstawił swoje **uczestnictwo w projektach krajowych i zagranicznych**, na które składają się wspomniany już wcześniej projekt Diamentowy Grant oraz dwa projekty, w których Doktorant był współwykonawcą – projekt SZAFIR finansowany z NCBiR oraz projekt Horyzont 2020.

W kolejnej części rozprawy Autor przedstawia własny **dorobek naukowy wchodzący w skład rozprawy doktorskiej**. Są to trzy publikacje eksperymentalne oraz dwie prace przeglądowe, w których Pan dr Rafał Szelenberger jest pierwszym autorem. Łączny Impact Factor publikacji

eksperymentalnych jest bardzo wysoki i wynosi 17,603 a prac przeglądowych - 5,23, co daje sumaryczny IF = **22,833**. Bardzo wysoko oceniam dorobek Doktoranta, w którym wykazał, że potrafi zarówno planować i prowadzić badania, jak również podsumować je syntetycznie w artykułach przeglądowych.

W części **Dorobek naukowy niewchodzący w skład rozprawy doktorskiej** przedstawiono cztery publikacje przeglądowe (IF = 20, 699) i trzy eksperymentalne (IF = 12,893). Daje to sumaryczny dorobek naukowy Doktoranta = **IF = 56,425**, co uważam za duże osiągnięcie i oceniam bardzo wysoko.

Na dorobek naukowy składa się również udział Doktoranta w ośmiu krajowych i dwóch zagranicznych konferencjach naukowych, gdzie prezentował On wyniki prowadzonych badań.

Wstęp pracy.

W tej części Autor bardzo szczegółowo przedstawia tło naukowe dla podjęcia swoich badań. Wyjaśnia czym są Ostre Zespoły Wieńcowe, jak się dzielą w zależności od obserwowanego obrazu klinicznego oraz jakie manifestacje kliniczne oraz pojawianie się lub brak konkretnych markerów biochemicznych można zaobserwować w przebiegu zawału mięśnia sercowego z uniesieniem odcinka ST, bez uniesienia odcinka ST oraz w przypadkach niestabilnej dławicy piersiowej. Wspólnym mechanizmem leżącym u podstaw patofizjologii jest miażdżycza naczyń wieńcowych, prowadząca do dysfunkcji śródbłonna naczyń krwionośnych. To z kolei, wywołuje pobudzenie płytek krwi, które uczestniczą we wzmożonej propagacji stanów zapalnych oraz indukcją potencjału prozakrzepowego krwi. W konsekwencji, dochodzi do blokady przepływu krwi w naczyniach wieńcowych, skutkujące wystąpieniem Ostrego Zespołu Wieńcowych. Następnie, Autor szczegółowo omawia znaczenie płytkowych receptorów powierzchniowych w występowaniu OZW, wymieniając badania wykazujące powiązania zmian w sekwencjach genów wielu receptorów oraz poziom ich ekspresji w zależności od genetycznego wariantu receptora. Omawia również aktualną wiedzę dotyczącą roli mutacji typu SNP, wariantów polimorficznych genów kodujących omawiane receptory w występowaniu OZW. Podkreśla dalej, że mimo podejmowania licznych badań, konieczne są dalsze prace mające na celu poszukiwanie i testowanie skutecznych biomarkerów mogących służyć do monitorowania takich zaburzeń kardiologicznych.

W następnej części Wstępu Doktorant szeroko omawia aktualny stan wiedzy w temacie tych badań, których podjął się w przedstawionej rozprawie doktorskiej a mianowicie roli potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów z udziałem miRNA. Autor krytycznie analizuje i ocenia możliwości analiz tego typu. W konkluzji stwierdza, że jak dotychczas, brak jest pełnych, kompleksowych badań porównawczych pełnego profilowania płytkowego miRNA u pacjentów z OZW i u osób zdrowych. I dalej stwierdza, że cyt. „*Scharakteryzowanie na poziomie molekularnym czynnościowych zaburzeń płytek krwi mogłoby pomóc w lepszym poznaniu podłoża patologicznej aktywacji tych komórek zaangażowanych w powstawanie powikłań zakrzepowo-zatorowych*”. Nie mam uwag do tej części pracy i oceniam ją wysoko.

Cel pracy.

W swojej rozprawie doktorskiej Autor postawił dwa główne cele:

1. Określenie zaburzeń w transkryptomie i proteomie płytek krwi, które mogłyby stanowić przyczynę ich wzmożonej aktywności prozakrzepowej w OZW oraz
2. Identyfikacja cząsteczek o potencjale wysokoczułych molekularnych markerów płytkowych, określających predyspozycje do wystąpienia OZW.

W kontekście omówionego wcześniej stanu wiedzy, dotyczącego patofizjologii OZW, cele pracy zostały postawione właściwie. W szczególności drugi cel zasługuje na uwagę, ze względu na duży potencjał praktyczny zastosowania dla identyfikowanych molekularnych markerów.

Nie mam uwag do tej części rozprawy doktorskiej.

Materiał i metody.

Materiał do badań – krew uzyskana od pacjentów z potwierdzonym koronograficznie OZW oraz od zdrowych dawców została zakwalifikowana zgodnie z regułami włączenia i wykluczenia pacjentów do badań oraz złożyli pisemne oświadczenie, w którym wyrazili zgodę na uczestnictwo w badaniach Pacjenci, jaki osoby z grupy kontrolnej stanowili grupy homologiczne względem wieku, liczebności płci oraz wieku. Doktorant uzyskał również konieczną zgodę Komisji ds. Etyki Badań Naukowych Uniwersytetu Łódzkiego.

Metody. Spektrum metodyki badawczej zastosowanej w niniejszej rozprawie robi duże wrażenie. Począwszy od izolacji płytek krwi, izolacji całkowitego RNA, mRNA, syntezy mikro-cDNA, analizy porównawczej profili mRNA i pomiaru ekspresji płytkowego miRNA oraz mRNA metodą qPCR, analiz frakcji białkowych płytek, oznaczania ekspresji receptorów, wizualizacji dystrybucji receptora P2Y12 z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej, proteomicznych analizach porównawczych płytek krwi, identyfikacji białek płytkowych metodą nanoLC-MS/MS, rozdzielów elektroforetycznych białek krwi metodą Western Blot, a skończywszy na rozbudowanych analizach statystycznych. Całość pokazuje, że Doktorant posiadał znajomość bardzo zróżnicowanej palety metod, koniecznej dla realizacji postawionych celów badawczych, co oceniam bardzo wysoko.

Wyniki i Dyskusja.

W tej części rozprawy doktorskiej Pan mgr Rafał Szelenberger przedstawił wyniki swoich badań, opublikowanych w trzech czasopismach naukowych. W pierwszej z nich (trzecia na liście załączonych publikacji) wykazał, że wybrane cząsteczki mi RNA wykazują dużą zmienność pomiędzy pacjentami ze zdiagnozowanym OZW a badaną grupą kontrolną. Konkluduje zatem słusznie, że nie powinny być one wykorzystywane razem jako molekularne markery w modelu diagnostycznym. Jednak uzyskane wyniki wskazały, że hsa-miR-142-3p wraz z AST posiada wysoki współczynnik czułości i specyficzności w różnicowaniu porównywanych grup, co sugeruje, że wytypowane markery mogłyby w przyszłości posłużyć jako elementy wieloczynnikowego modelu określającego predyspozycje do wystąpienia OZW.

Kolejna część rozprawy to wyniki opublikowane w Publikacji nr 2 (czwarta na liście załączonych publikacji), dotyczące analizy porównawczej poziomu ekspresji płytkowych receptorów powierzchniowych u pacjentów ze zdiagnozowanym OZW oraz w odpowiedniej grupie kontrolnej. W tej części pracy wykazano, że z pięciu badanych płytkowych receptorów powierzchniowych, cztery – P2Y12, GP1BB, ITGA2B oraz ITGB3 wykazywały istotną statystycznie nadekspresję w porównaniu do grupy kontrolnej. Koncentrując się następnie na szczegółowych analizach i badaniach receptora P2Y12 oraz hsa-miR-223-3 Autor sugeruje, że cząsteczka ta nie jest głównym regulatorem ekspresji tego receptora a wyjaśnieniem jednoczesnej podwyższonej ekspresji zarówno genu P2Y12 oraz jego ujemnego regulatora, może być reakcją organizmu na przebiegający proces patologiczny w celu przywrócenia homeostazy. Biorąc pod uwagę analizy statystyczne poziomu ekspresji receptora na poziomie RNA, stężeń białka P2Y12 oraz ekspresji płytkowego hsa-miR-223-3p, w analizach krzywej ROC wykazano, że uzyskany model osiągnął wysoką czułość (97%) i specyficzność (74%) w odróżnianiu pacjentów z OZW i dawców z grupy kontrolnej.

Ostatnia część omawianych wyników, zdecydowanie najciekawsza i bardzo wartościowa, to rezultaty opublikowane w trzeciej pracy eksperymentalnej (piąta na liście załączonych publikacji). Doktorant przeprowadził przesiewową analizę porównawczą proteomu płytkowego metodą 2D-DIGE oraz identyfikację białek, których ekspresja była znacząco różna w obrębie porównywanych grup – pacjentów z OZE i grupy kontrolnej. Autor zidentyfikował sześć białek, których stężenie było znacząco różne w porównywanych grupach. W przypadku winkuliny i apolipoproteiny A1 stężenie to było obniżone u pacjentów z OZW, natomiast poziom stężenia białek łańcuchów α i β fibrynogenu, łańcucha β tubuliny oraz transgeliny-2 był znacząco zwiększony u pacjentów z OZW. Pokazane analizy wskazują, że zastosowana metodyka badawcza i uzyskane rezultaty mogą stanowić podstawę do opracowania skutecznego panelu diagnostycznego pacjentów z Ostrem Zespołem wieńcowym.

Przedstawione przez Doktoranta wyniki są szeroko dyskutowane w oparciu o dostępne dane literaturowe, jak również w dwóch pracach przeglądowych, wchodzących w skład niniejszej rozprawy (czwarta i piąta na liście załączonych publikacji). Bardzo wysoko oceniam sposób prezentacji wyników oraz ich dyskusję.

Wnioski.

W tej sekcji Autor przedstawił główne wnioski, wynikające z Jego pracy. Przede wszystkim, że:

1. zmiany proteomiczne oraz transkryptomyczne zidentyfikowane w płytkach krwi wskazują na molekularne podłoże ich wzmożonej aktywności prozakrzepowej w OZW oraz
2. **wykryte zaburzenia w ekspresji płytkowych cząsteczek miRNA pomiędzy badanymi grupami wykazują zdolność do różnicowania pacjentów z OZW od zdrowych dawców.**

Drugi wniosek uważam za kluczowy w prezentowanej rozprawie doktorskiej.

Streszczenie wersja polska i angielska).

W Streszczeniu Doktorant w sposób skrótowy syntetycznie podsumowuje wszystkie najważniejsze rezultaty i wnioski, podkreślając najważniejsze aspekty pracy doktorskiej. Nie mam uwag do tej części rozprawy.

Bibliografia.

Doktorant zamieścił 67 cytowanych pozycji literatury naukowej, co mogłoby się wydawać niewielką liczbą, ale do tej listy zaliczają się, jak rozumiem, również cytowania prac zamieszczone w opublikowanych pracach naukowych wchodzących w skład niniejszej rozprawy doktorskiej. Dlatego też, nie mam uwag krytycznych do tej części doktoratu.

Kopie publikacji

Doktorant zamieścił kopie trzech prac eksperymentalnych i dwóch prac przeglądowych, które stanowią podstawę niniejszej rozprawy doktorskiej. Nie mam uwag do tej części.

Oświadczenia współautorów.

Oświadczenia o udziale procentowym wszystkich współautorów w publikowanych rezultatach to niezwykle istotna część każdej rozprawy doktorskiej. W niniejszej dysertacji Pan mgr. Rafał Szelenberger przedstawił listę publikacji, w których Jego udział, zarówno w pracach eksperymentalnych, jak i przeglądowych, był wiodący i wynosił 40-50%. Co istotne, udział ten zawierał opracowania koncepcji prac przeglądowych, w przypadku prac eksperymentalnych – opracowanie koncepcji i formułowanie hipotez badawczych. Potwierdzają to złożone oświadczenia

od wszystkich współautorów prezentowanych prac. Bardzo wysoko oceniam zatem, wkład Doktoranta w prowadzone badania i Jego udział w opublikowanych pracach naukowych.

Biorąc pod uwagę postawione w Rozprawie cele badawcze, sposób przedstawienia wyników, ich interpretację i wnioskowanie uważam, przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska z pewnością **stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego** oraz zdecydowanie **prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Kandydata w dyscyplinie nauki biologiczne oraz umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.**

Podsumowując, stwierdzam, że rozprawa doktorska Pana Rafała Szelenbergera zatytułowana: "Poszukiwanie w płytkach krwi molekularnych markerów określających predyspozycje człowieka do wystąpienia Ostrego Zespołu Wieńcowych" **spełnia wymagania Ustawy** z dnia 14 marca 2003 r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595 z późn. zm.) i wnoszę do Komisji ds. Stopni Naukowych w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie Pana mgr. Rafała Szelenbergera do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, biorąc pod uwagę wysoki dorobek naukowy Kandydata, Jego dużą wiedzę i umiejętność planowania i przeprowadzania badań naukowych, wnoszę do Szanownej Komisji o **wyróżnienie rozprawy.**

Z poważaniem,



Prof. dr hab. Paweł Parniewski