



dr hab. Monika Szeliga
Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. Mirosława Mossakowskiego
Polska Akademia Nauk
Zakład Neurotoksykologii
ul. Pawińskiego 5
02-106 Warszawa

Warszawa, 11 sierpnia 2022 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Rafała Szelenbergera

pt. „Poszukiwanie w płytkach krwi molekularnych markerów określających predyspozycje człowieka do wystąpienia Ostrych Zespołów Wieńcowych”

wykonanej w Katedrze Biochemii Ogólnej Instytutu Biochemii
Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego

promotor: prof. dr hab. Joanna Saluk-Bijak

promotor pomocniczy: dr n. med. Michał Kacprzak

Ostre zespoły wieńcowe (OZW) stanowią coraz częściej występującą grupę chorób kardiologicznych o zróżnicowanym obrazie klinicznym. Obraz ten, wraz z wynikami badania elektrokardiograficznego oraz poziomem biochemicznych markerów niedokrwienia mięśnia sercowego stanowi podstawę klasyfikacji OZW. Główne rodzaje OZW to: zawał mięśnia sercowego z uniesieniem odcinka ST (STEMI), zawał mięśnia sercowego bez uniesienia odcinka ST (NSTEMI) i niestabilna dławica piersiowa (UA). Wspólną przyczyną patofizjologiczną OZW jest pęknięcie blaszki miażdżycowej i wytworzenie na jej powierzchni skrzepliny złożonej głównie z płytek krwi. OZW odpowiadają za znaczną część nagłych zgonów sercowych, a prawidłowe rozpoznanie OZW pozostaje wyzwaniem.

W tym kontekście, podjęte przez Doktoranta badania dotyczące molekularnych mechanizmów odpowiadających za wzmożoną aktywność pro-zakrzepową płytek krwi w OZW są interesujące poznawczo, ale mogą mieć także potencjał aplikacyjny.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi spójny tematycznie cykl pięciu publikacji, dwóch przeglądowych i trzech doświadczalnych, opublikowanych w renomowanych czasopismach z listy JCR. Sumaryczna wartość współczynnika oddziaływania

IF tych prac wynosi 22,833 (580 punktów MEiN). Wszystkie publikacje są pracami zespołowymi, liczba autorów waha się od 5 do 9. We wszystkich pracach Doktorant jest pierwszym i – co rzadkie na tym etapie drogi naukowej – korespondującym autorem. Zgodnie z oświadczeniami współautorów, udział Doktoranta w powstaniu publikacji wahał się między 40 a 50%. W przypadku obu prac przeglądowych, poza zebraniem literatury, Doktorant brał udział w opracowaniu koncepcji pracy oraz w przygotowaniu zarówno wstępnej, jak i końcowej wersji manuskryptu, graficznego przedstawienia danych i odpowiedzi dla recenzentów. W przypadku prac eksperymentalnych, Doktorant brał udział w sformułowaniu hipotezy badawczej, wykonał zdecydowaną większość eksperymentów i znaczną część analiz, uczestniczył w opracowaniu i interpretacji wyników, a także przygotował każdy z manuskryptów i odpowiedzi dla recenzentów.

Układ przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej jest klarowny i poprawny przy tego typu formacie pracy, opartym na monotematycznym cyklu publikacji. W liczącym 8 stron *Wstępie*, Autor przedstawia obecny stan wiedzy dotyczącej patofizjologii OZW wskazując na istotną, aczkolwiek nadal nie w pełni zdefiniowaną, rolę płytek krwi. Przytacza także kolejne badania mające na celu zidentyfikowanie markerów OZW, które pozwoliłyby na poszerzenie diagnostyki pacjentów. Wreszcie bardzo zwięźle charakteryzuje miRNA i ich rolę w chorobach układu krążenia. Wiedza przedstawiona we *Wstępie* w znacznym stopniu pokrywa się z treścią dwóch prac przeglądowych (R. Szelenberger i wsp. „*Blood platelet surface receptor genetic variation and risk of thrombotic episodes.*” Clin. Chim. Acta. 2019; 496:84-92. doi: 10.1016/j.cca.2019.06.020. oraz R. Szelenberger i wsp. „*Plasma MicroRNA as a novel diagnostic.*” Clin. Chim. Acta. 2019; 499:98-107. doi: 10.1016/j.cca.2019.09.005.) wchodzących w skład cyklu publikacji stanowiącego podstawę do ubiegania się o stopień naukowy doktora. Szkoda, że Autor nie odniósł się w żadnym momencie tego rozdziału do owych publikacji, tak jak to uczynił w kolejnych rozdziałach powołując się na prace eksperymentalne. *Wstęp* zakończony jest uzasadnieniem podjęcia wybranej tematyki badawczej, a w kolejnym rozdziale Doktorant klarownie formułuje główne cele pracy, z których pierwszym było zidentyfikowanie zmian w transkryptomie i proteomie płytek krwi potencjalnie stanowiących przyczynę ich wzmożonej aktywności pro-zakrzepowej w OZW, a drugim zidentyfikowanie cząsteczek o potencjale płytkowych markerów określających predyspozycje do wystąpienia OZW.

W rozdziale poświęconym metodologii Autor szczegółowo charakteryzuje materiał badawczy oraz liczne i różnorodne techniki wykorzystane w przeprowadzonych badaniach.

Szczególnie cenne w tej części pracy wydają się być uzasadnienia doboru poszczególnych metod, które mogą stanowić istotną wskazówkę dla badaczy podejmujących podobne wyzwania.

W rozdziale poświęconym wynikom Doktorant zwięźle przedstawia uzyskane dane odnosząc się do poszczególnych prac eksperymentalnych stanowiących podstawę dysertacji. Fakt, że omawiając kolejne wyniki Autor powołuje się na konkretne ryciny w tychże publikacjach znacząco ułatwia czytelnikowi zrozumienie analizowanych danych. Należy także podkreślić, że w tym rozdziale Doktorant nie tylko klarownie przedstawił uzyskane wyniki, ale także przedyskutował je na tle danych z piśmiennictwa.

Szczególnie interesującym aspektem przeprowadzonych badań jest identyfikacja płytkowych miRNA wykazujących największe zmiany w poziomie ekspresji pomiędzy pacjentami z OZW a grupą kontrolną. Wyniki te stały się punktem wyjścia do szerokiej analizy bioinformatycznej, która finalnie wyłoniła sekwencje mRNA docelowe dla cząsteczek miRNA różnicujących OZW oraz wykazała, że poziom hsa-miR-142-3p wraz z poziomem aminotransferazy asparaginianowej (AST) mają wysoki współczynnik czułości i specyficzności w różnicowaniu porównywanych grup. Powyższe dane zostały opublikowane w pracy R. Szelenberger i wsp. „*Screening analysis of platelet miRNA profile revealed miR-142-3p as a potential biomarker in modeling the risk of Acute Coronary Syndrome.*” *Cells*. 2021; 10(12):3526. doi: 10.3390/cells10123526.

W kolejnym etapie badań Doktorant przeprowadził analizę porównawczą poziomu ekspresji płytkowych receptorów powierzchniowych pomiędzy pacjentami z OZW a grupą kontrolną. U pacjentów z OZW Autor zaobserwował zwiększony poziom ekspresji genów kodujących cztery receptory: *P2Y12*, *GP1BB*, *ITGA2B* oraz *ITGB3*, a także podwyższony poziom białek GPIIb i P2Y12, głównego celu w terapii przeciwplatekowej pacjentów z OZW. Dalsze badania prowadzone przez Doktoranta wykazały u pacjentów z OZW podwyższony poziom ekspresji hsa-miR-223-3p, potencjalnego negatywnego regulatora ekspresji *P2Y12*. Brak istotnej korelacji pomiędzy poziomem ekspresji *P2Y12* i hsa-miR-223-3p skłonił Autora do konkluzji, że hsa-miR-223-3p najprawdopodobniej nie jest głównym regulatorem ekspresji *P2Y12*. Co istotne, model diagnostyczny wykorzystujący poziom ekspresji *P2Y12* i hsa-miR-223-3p okazał się mieć wysoką czułość i specyficzność w odróżnianiu pacjentów z OZW od osób bez zaburzeń sercowo-naczyniowych. Powyższe dane zostały zebrane w pracy R. Szelenberger i wsp. „*Dysregulation in the Expression of Platelet Surface Receptors in Acute*

Coronary Syndrome Patients-Emphasis on P2Y12.” *Biology* (Basel). 2022; 11(5):644. doi: 10.3390/biology11050644.

W kolejnych badaniach Doktorant zaobserwował obniżone stężenie winkuliny i apolipoproteiny A1 oraz podwyższony poziom łańcuchów β i γ fibrynogenu, łańcucha β tubuliny oraz transgeliny-2 u pacjentów z OZW w porównaniu do grupy kontrolnej. Jednocześnie udokumentował brak płytkowych transkryptów dla genów kodujących apolipoproteinę A1 oraz łańcuchy fibrynogenu, nadekspresję genów kodujących winkulinę i transgelinę-2 oraz brak zmian w poziomie ekspresji genu kodującego łańcuch β tubuliny. Dane dotyczące poziomu winkuliny i transgeliny-2 zostały przedyskutowane, zabrakło natomiast dyskusji dotyczącej rozbieżności między podwyższonym poziomem łańcuchów β i γ fibrynogenu a brakiem odpowiednich transkryptów. Pominięcie tych rozważań w dysertacji pozostawia pewien niedosyt, choć należy zaznaczyć, że są one zawarte w publikacji przedstawiającej tę część wyników uzyskanych przez Doktoranta (R. Szelenberger i wsp. „*Variations in Blood Platelet Proteome and Transcriptome Revealed Altered Expression of Transgelin-2 in Acute Coronary Syndrome Patients.*” *Int. J. Mol. Sci.* 2022; 23(11):6340. doi: 10.3390/ijms23116340.).

W następnym rozdziale dysertacji Autor przedstawia dwa wnioski, pod każdym z nich wymieniając trzy punkty, z których część zawiera obserwacje poczynione w trakcie wykonywania eksperymentów. Uważam, że szczególnie pierwszy z wniosków jest zbyt lakoniczny i nie oddaje w pełni osiągnięć prezentowanych badań.

Kolejnymi rozdziałami dysertacji są streszczenia w języku polskim i angielskim i spis literatury liczący 67 pozycji. Dobór literatury jest odpowiedni, powiązany z tematyką pracy i świadczy o bardzo dobrej orientacji Doktoranta w podjętej tematyce. Do rozprawy dołączone są kopie publikacji i oświadczenia współautorów wskazujących zakres ich pracy i procentowy udział w przygotowanie publikacji naukowych, które stanowią monotematyczny cykl publikacji będący podstawą o ubieganie się o stopień naukowy doktora.

W trakcie czytania pracy nasunęło mi się następujące pytanie:

Istnieją przynajmniej trzy rodzaje OZW. Czy zdaniem Doktoranta możliwe jest zidentyfikowanie molekularnych markerów różnicujących poszczególne rodzaje OZW?

Kontynuując powyższą myśl, pojawia się kolejne pytanie:

Czy Doktorant próbował podzielić pacjentów na grupy ze względu na rodzaj OZW i analizować otrzymane wyniki jako dwie albo trzy niezależne grupy badane?

Przedstawione w powyższej recenzji uwagi dotyczące niektórych elementów dysertacji nie umniejszają wartości całej pracy i nie mają istotnego znaczenia dla mojej wysokiej oceny rozprawy doktorskiej Pana mgr. Rafała Szelenbergera.

Podsumowując opinię stwierdzam, że Doktorant znakomicie wywiązał się z zadań, jakie zostały postawione w celach pracy. Uzyskane wyniki są nowatorskie i wnoszą istotny wkład do wiedzy z zakresu molekularnych mechanizmów odpowiadających za wzmożoną aktywność pro-zakrzepową płytek krwi w OZW. Jednocześnie zidentyfikowanie potencjalnych markerów określających predyspozycje do wystąpienia OZW ma duży potencjał praktyczny. Zaplanowane i przeprowadzone przez Doktoranta badania, jak również będące ich efektem publikacje wskazują na to, że mgr Rafał Szelenberger jest dojrzałym badaczem, potrafiącym dobrać ciekawy temat o istotnym znaczeniu poznawczym i praktycznym. Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska autorstwa mgr. Rafała Szelenbergera spełnia wszystkie ustawowe wymagania stawiane pracom doktorskim. W związku z powyższym zwracam się do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. Stopni Naukowych w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne z wnioskiem o dopuszczenie mgr. Rafała Szelenbergera do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, biorąc pod uwagę wskazane w recenzji osiągnięcia Autora, wysoki poziom naukowy rozprawy oraz fakt, że dysertacja powstała w oparciu o pięć monotematycznych artykułów opublikowanych w czasopismach z listy filadelfijskiej o łącznym współczynniku oddziaływania 22,833, wnoszę do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. Stopni Naukowych w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne o wyróżnienie pracy doktorskiej Pana mgr. Rafała Szelenbergera stosowną nagrodą. Uzyskane wyniki mają nie tylko dużą wartość poznawczą, ale także potencjał aplikacyjny w dalszych badaniach zmierzających do identyfikacji markerów predysponujących do wystąpienia OZW.

dr hab. Monika Szeliga, prof. IMDiK

