



**KLINIKA PNEUMONOLOGII
KATEDRA PNEUMONOLOGII I ALERGOLOGII
GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY**

Kierownik: prof. dr hab. med. Jan Marek Słomiński
ul. Dębinki 7, 80-211 Gdańsk, tel: (58) 349 16 25; fax: (58) 341 16 77

prof. dr hab..med. Anna Dubaniewicz
prof. nadzw. GUMed
Klinika Pneumonologii
Katedra Pneumonologii i Alergologii GUMed
e-mail: aduban@gumed.edu.pl
tel./fax.: +58 349 15 13

Gdańsk, dn.11.04.2017

Ocena Rozprawy Doktorskiej

mgr Justyny Kiszalkiewicz

**“Ocena ekspresji wybranych klas miRNA oraz ich genów docelowych
uczestniczących w szlaku sygnałowym TGF-β/SMAD
oraz osi HIF-1α/VEGF/ING-4 w przebiegu sarkoidozy – poszukiwanie nowych
markerów diagnostycznych”**

Promotor

prof.dr hab.n.med. Ewa Brzezińska-Lasota

Zakład Molekularnych Podstaw Medycyny, I Katedra Chorób Wewnętrznych,
Wydział Lekarski, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

W przedstawionej mi do oceny pracy podjęto bardzo ważne zagadnienie etiopatogenezy sarkoidozy, choroby wielonarządowej o nieustalonej etiologii.

Uważa się, że u osób predysponowanych genetycznie, czynniki środowiskowe (infekcyjne, jak i nieinfekcyjne) indukują rozwój ziarniny sarkoidalnej w zajętych chorobowo narządach z dominacją limfocytów CD4⁺ nad CD8⁺, przy niedoborze komórek CD4⁺ we krwi obwodowej. To polimorfizmy genów HLA i spoza układu HLA, kodując ekspresję receptorów powierzchniowych i wewnątrzkomórkowych, białek, elementów szlaków sygnałowych, cytokin czy enzymów, wpływają na zmienioną funkcję komórek gospodarza i warunkują rozwój tej ziarniny w odpowiedzi na w/w czynniki środowiskowe. Pomimo, że dokonał się ogromny postęp

w dziedzinie immunogenetyki sarkoidozy, to molekularne mechanizmy, regulujące powstawanie, jak i przebieg tej choroby, pozostają nie w pełni poznane.

I w tym punkcie rozprawa mgr Justyny Kiszalkiewicz wpisuje się w nurt aktualnych i niezwykle istotnych badań.

Doktorantka przeprowadziła analizę poziomu ekspresji wybranych klas miRNA oraz ich genów docelowych, uczestniczących w szlaku sygnałowym *TGF-β/SMAD* oraz osi *HIF-1α/ING-4/VEGF* u chorych na sarkoidozę układu oddechowego i u zdrowych osób. Oceeniła poziom względnej ekspresji klas miRNA: let-7-f, miR15b, miR-16, miR-20a, miR-27b, miRNA-128b, miR-130, miR-192, miR-221, miR-222, regulujących na drodze pośredniej i/lub bezpośredniej w/w szlaki sygnałowe. Określiła także zależność pomiędzy poziomami ekspresji badanych genów i klas miRNA a obrazem radiologicznym (fazy I-IV choroby), klinicznym (postać ostra i przewlekła choroby), wartościami testów czynnościowych płuc (spirometria, DLCO), markerami biochemicznymi (poziom wapnia) czy fenotypem immunologicznym ($CD4^+/CD8^+$) w badanych grupach.

Praca Pani Justyny Kiszalkiewicz ma typowy i właściwy układ dla rozprawy doktorskiej, liczy 167 stron, 38 tabel i 58 rycin. Rozprawa zaopatrzona jest wstępem, wylistowaniem celów, charakterystyką grup badanych i metod badawczych, omówieniem wyników, dyskusją, a także wnioskami końcowymi. Doktorantka posłużyła się nowoczesnym i wyczerpującym piśmiennictwem obejmującym 234 pozycje, zestawione wg kolejności cytowania. Rozprawę kończy wykaz imponującego dorobku naukowego Pani Justyny Kiszalkiewicz: 14 prac o łącznym współczynniku oddziaływania $IF = 31,572$ i punktacją ministerialną 348,00.

We wstępie Doktorantka zawarła informacje, dotyczące aktualnego stanu wiedzy w zakresie etiopatogenezy sarkoidozy. Początkowo przedstawia Ona efekt procesu zapalnego, jakim jest ziarninak sarkoidalny, by następnie przejrzeć omówić i graficznie zaprezentować poszczególne etapy jego tworzenia. W dalszej części pracy, Autorka dokładnie zapoznaje czytelnika z aktualnymi hipotezami, dotyczącymi mechanizmów rozwoju sarkoidozy. Przedstawia koncepcję środowiskową, mykobakteryjną, wirusową, immunologiczną i teorię genetyczną. W tej ostatniej, Doktorantka szczegółowo omawia aktualny stan wiedzy na temat udziału polimorfizmów genów układu zgodności tkankowej HLA, jak również genów spoza układu HLA, tj. *TGF-β*, *VEGF*, *TNF-α*, *IFN-α*, *IL-18*, *TLRs*, *IL-1*, *CC10* oraz *CCR2* w etiopatogenezie sarkoidozie. Następnie w sposób bardzo dokładny przedstawia i podkreśla rolę szlaku *TGF-β/SMAD* w odpowiedzi immunologicznej w przebiegu tej choroby, co znalazło uznanie w posacie nowatorskich publikacji Jej autorstwa. Ponadto omawia aktywację osi *HIF-1α/VEGF-A/ING-4* w środowisku hipoksji w miąższu płuc oraz udział regulacji miRNA w procesach patologicznych zachodzących w tym narządzie, także w sarkoidozie.

W tej części pracy, chciałbym jedynie zwrócić uwagę na informację zawartą w podrozdziale Epidemiologia: to u Afro-Amerykanów, nie u chorych rasy Kaukaskiej, sarkoidoza jest bardziej zaawansowana i ma częściej charakter wielonarządowy. Także, w podrozdziale Etiopatogeneza ma miejsce niepoprawna informacja: w płynie z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego (ang. BALF) pacjentów z sarkoidozą płuc w fazie I-II dominują przede wszystkim limfocyty $CD4^+$ a nie jak podano eozynofile i neutrofile; poza tym faza 0 dotyczy tylko postaci pozapłucnych choroby.

Pomimo tych uwag szczegółowość przedstawienia etiopatogenetycznych mechanizmów rozwoju tej choroby wskazuje na głęboką wiedzę i przygotowanie Pani Justyny Kiszalkiewicz do pracy naukowo-badawczej.

Na podstawie zaprezentowanych danych, Doktorantka sformułowała poprawnie cele, które są oryginalne i wykazują cechy postępu badawczego w zakresie podjętego w/w tematu.

Badania przeprowadzono wśród losowo wybranej grupy 94 chorych, u których rozpoznano sarkoidozę. Kryterium włączenia do grupy badanej był obraz kliniczny oraz wynik badania histopatologicznego, potwierdzający rozpoznanie tej choroby. Wszyscy pacjenci w momencie badania pozostawali bez leczenia. Do grupy kontrolnej zostało włączonych 50 zdrowych osób.

Natomiast do przedstawionego rozdziału Materiał mam kilka uwag:

Zarówno w sekcji Materiał, jak i w rozdziale Wyniki zwraca uwagę brak danych, dotyczących liczby pacjentów w poszczególnych fazach choroby. Moim zdaniem, także grupowanie pacjentów powinno być przeprowadzone w oparciu o chorych w stadium I-II vs. III-IV sarkoidozy, tak by odpowiedzieć na pytanie czy badane parametry są charakterystyczne dla procesu włóknienia mięszu płuc w tej chorobie? Ponadto zwraca uwagę brak danych odnośnie wieku, płci badanych w grupie kontrolnej.

Materiał do badań stanowiła krew obwodowa, surowica oraz materiał z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego. Doktorantka zastosowała nowoczesne metody molekularne (izolacja RNA/miRNA, ocena jakościowa i ilościowa kwasów nukleinowych, reakcja odwrotnej transkrypcji, reakcja amplifikacji w czasie rzeczywistym) oraz metodę „Sandwich” ELISA z użyciem komercyjnych zestawów odczynników uznanych na świecie firm.

Metody zostały opisane wyczerpująco i szczegółowo, co pozwala na ewentualne powtórzenie doświadczeń. Sposób korzystania z obliczeń statystycznych Autorki świadczy o dużej wiedzy i dobrym opanowaniu warsztatu.

Wyniki badania podzielono według poszczególnych etapów analizy i przedstawiono w przejrzysty sposób: opis, tabela i ilustrująca wynik barwna rycina. Operowanie odpowiednio dobranymi kolarami podkreśla znaczenie stwierdzonych różnic statystycznych.

Przeprowadzone nowatorskie badania Doktorantki wykazały duże znaczenie szlaków sygnałowych *TGF-β/SMAD*, osi *HIF-1A/VEGF/ING-4* oraz miRNA w regulacji zapalenia, w sarkoidozie płuc. Co więcej *TGF-β*, *SMAD3*, *HIF-1α* na poziomie miRNA oraz białka *SMAD2*, *VEGF* i *miR-15b*, *miR-27b* *miR-192*, *miR-221*, *miR-222*, *miR-130a*, *miR-let7* mogą mieć potencjał różnicujący chorych na sarkoidozę od osób zdrowych, a *miR-16*, *miR-20a*, *miR-27b*, *miR-let7f*, *miR-192*, *HIF-1A* mogą stanowić marker diagnostyczny o negatywnej wartości prognostycznej:

Oceniając ekspresję wybranych genów szlaku sygnałowego *TGF-β/SMAD* u chorych nie wykazała Ona istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji genów *TGF-β*, *SMAD 2,3* oraz *SMAD7* w komórkach z BALF u chorych w stosunku do grupy kontrolnej. Natomiast w limfocytach krwi obwodowej Doktorantka stwierdziła statystycznie wyższy poziom ekspresji genów *TGF-β* oraz *SMAD3* w sarkoidozie niż w zdrowej kontroli. Analiza ekspresji badanych genów u tych pacjentów zarówno w płynie z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego, jak i w limfocytach krwi obwodowej chorych zgodnie z podziałem klinicznym oraz obrazem radiologicznym nie ujawniła istotnie statystycznych różnic. Natomiast odnotowała Doktorantka statystycznie wyższy poziom ekspresji genów *TGF-β*, *SMAD3* oraz *HIF-1α* w komórkach z BALF w grupie chorych z zaburzeniem wentylacji o typie restrykcyjnym w stosunku do pacjentów

z prawidłowymi parametrami spirometrii. Stwierdziła także ujemne korelacje pomiędzy poziomem ekspresji genów *SMAD 3 i 2* a wartościami parametrów ocenianych podczas spirometrii.

Analiza ekspresji wybranych genów osi *HIF-1 α /ING-4/VEGF* ujawniła istotny statystycznie wyższy poziom ekspresji *HIF-1 α* w PBMC w grupie chorych na sarkoidozę niż w grupie zdrowych badanych.

Podczas oceny immunoekspresji Doktorantka odnotowała wyższy poziom TGF- β , SMAD2 oraz VEGF w surowicy pacjentów w zestawieniu ze zdrowymi osobami, co może mieć znaczenie diagnostyczne w tej chorobie.

Ocena ekspresji wybranych klas miRNA w komórkach z BALF ujawniła statystycznie istotne różnice w ekspresji miRNA pomiędzy grupą chorych a zdrową kontrolą: Autorka wykazała wyższy poziom ekspresji miR-221 i miR-192 oraz niższą ekspresję miR-15b w grupie pacjentów niż wśród zdrowych osób. Stwierdziła także znamienne różnice w poziomie ekspresji miRNA w komórkach z BALF pomiędzy chorymi w stadium I vs. II-IV: odnotowała wyższą ekspresję miR-27b, miR-192 oraz dla miR-221 u chorych w stadium I sarkoidozy. Ponadto dla tych samych miRNA, Doktorantka ujawniła statystycznie istotne różnice w średnich wartościach względnego poziomu ekspresji miRNA pomiędzy grupą pacjentów z ostrą vs. przewlekłą postacią choroby, z wyższym poziomem ekspresji miRNA u chorych z aktywną postacią sarkoidozy. Odnotowała Ona również w komórkach z BALF znamienne różnicę w średnich wartościach względnego poziomu ekspresji miRNA pomiędzy chorymi z prawidłową spirometrią vs. pacjentami z zaburzeniem wentylacji o typie restrykcyjnym, dla miRNA-16 i miR-20a z ich wyższym poziomem ekspresji u chorych z zaburzeniami wentylacji.

W limfocytach krwi obwodowej, Doktorantka stwierdziła statystycznie istotne różnice w ekspresji miRNA pomiędzy grupą chorych a zdrowymi osobami: wykazała Ona wyższą ekspresję miR-27b, miR-192, miR-221 i miR-222 wśród pacjentów, podczas gdy w grupie kontrolnej był wyższy poziom ekspresji miR-let7f i miR-130a. Ponadto Autorka odnotowała znamienne różnice w poziomie ekspresji miRNA pomiędzy chorymi w stadium I vs. II-IV: stwierdziła Ona wyższą ekspresję miR-16 tylko w fazie I sarkoidozy. Ujawniła także statystycznie istotne różnice w ekspresji miRNA pomiędzy pacjentami z ostrą vs. przewlekłą postacią choroby: stwierdziła Ona wyższy poziom ekspresji miRNA-130 i miR-15b u pacjentów z ostrą postacią sarkoidozy niż przewlekłą. Doktorantka odnotowała także znamienne różnice w poziomie ekspresji miRNA pomiędzy chorymi z prawidłową spirometrią, a pacjentami z obturacją płuc: wykazała Ona wyższą ekspresję miRNA-let-7f u chorych z występującą obturacją w porównaniu do chorych z prawidłowymi wynikami spirometrii.

Pomiędzy komórkami z BALF a limfocytami krwi obwodowej stwierdzono statystycznie istotne różnice dla miRNA15b i miRNA-130a, z ich wyższym poziomem ekspresji w limfocytach oraz z wyższą ekspresją miRNA-let7f w komórkach z płynu oskrzelowo-pęcherzykowego.

W dyskusji, uzyskane oryginalne wyniki Doktorantka omówiła z głęboką znajomością tematu i odniosła je do wyników prac innych autorów.

Przeprowadzone badania pozwoliły na sformułowanie wniosków, stosownie do wyznaczonego głównego celu, ale nie do celów szczegółowych.

Praca napisana jest bardzo starannie, w zwięzłym, poprawnym stylu. W trakcie redakcji dysertacji nie można uniknąć drobnych błędów topograficznych, są one jednak techniczne i w żadnej mierze nie umniejszają wartości pracy. Odbiór pracy ułatwia zamieszczony na początku pracy spis skrótów zamieszczonych w tekście, jak i spis tabel oraz rycin na końcu rozprawy.

W podsumowaniu uważam, że Pani Justyna Kiszalkiewicz wykazała się dużą wiedzą z zakresu prowadzonych przez siebie badań. Udowodniła, że potrafi rozwiązać problem naukowy poprzez odpowiednie zaplanowanie badań, wykonanie doświadczeń oraz interpretację ich wyników. Uzyskała istotne naukowo dane, które poszerzają naszą wiedzę o genetycznych aspektach sarkoidozy płuc, szczególnie w zakresie wpływu wybranych klas miRNA oraz ich genów docelowych uczestniczących w szlaku sygnałowym TGF- β /SMAD oraz osi HIF-1 α /VEGF/ING-4 na rozwój tej choroby. Ponadto, Doktorantka oceniając zależność pomiędzy poziomami ekspresji w/w badanych parametrów a fenotypem radiologicznym, klinicznym, wartościami testów czynnościowych płuc, markerami biochemicznymi, czy fenotypem immunologicznym chorych na sarkoidozę płuc, wskazała na możliwość zastosowania niektórych z otrzymanych wyników w diagnostyce i prognozowaniu tej choroby.

Stwierdzam zatem, że przedstawiona do oceny rozprawa Pani Justyny Kiszalkiewicz spełnia wymogi pracy dla uzyskania stopnia doktora nauk medycznych zgodnie z obowiązującymi przepisami i upoważnia mnie do zwrócenia się do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, biorąc pod uwagę nowe podejście do problemu, polegające na określeniu roli miRNA oraz ich genów docelowych, uczestniczących w szlaku sygnałowym TGF- β /SMAD i osi HIF-1 α /VEGF/ING-4 nie tylko w etiopatogenezie sarkoidozy ale także i w praktyce klinicznej, a także samodzielność wykonania badań przez Doktorantkę – zaplanowanie i przeprowadzenie badań molekularnych oraz analizy ich wyników – zgłaszam wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani Justyny Kiszalkiewicz.

Z wyrazami szacunku
prof. dr hab. med Anna Dubantawicz
lekarz chorób wewnętrznych
specjalista chorób drzewa piersiowego
3716636
Anna Dubantawicz