



CENTRUM MEDYCZNE KSZTAŁCENIA PODYPLOMOWEGO  
**ZAKŁAD BIOCHEMII I BIOLOGII MOLEKULARNEJ**

Kierownik: prof. dr hab. Barbara Czarnocka

ul. Marymoncka 99, 01-813 WARSZAWA, Tel.: 48 22 56 93 812; Fax: 48 22 56 93 712,  
e-mail: [bczarnocka@cmkp.edu.pl](mailto:bczarnocka@cmkp.edu.pl)

---

Warszawa 28 kwietnia 2017

Ocena

rozprawy doktorskiej Pani mgr Justyny Kiszalkiewicz

**p.t. "Ocena ekspresji wybranych klas miRNA oraz ich genów docelowych uczestniczących w szlaku sygnałowym TGF- $\beta$ /SMAD oraz osi HIF-1 $\alpha$ /VEGF/ING-4 w przebiegu sarkoidozy- poszukiwanie nowych markerów diagnostycznych"**

Promotor prof. dr hab. n. med. Ewy Brzezińska-Lasota

Zakład Molekularnych Podstaw Medycyny,

I Katedra Chorób Wewnętrznych Wydziału Lekarskiego

Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Zgodnie z uchwałą Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, powołującą mnie do wypełnienia obowiązków recenzenta w przewodzie doktorskim Pani Justyny Kiszalkiewicz, przedkładam recenzję rozprawy doktorskiej przygotowanej pod kierownictwem naukowym Pani Prof. dr hab. n. med. Ewy Brzezińskiej-Lasota.

Równocześnie stwierdzam co następuje:

1. rozprawa doktorska Pani mgr Justyny Kiszalkiewicz pt. „Ocena ekspresji wybranych klas miRNA oraz ich genów docelowych uczestniczących w szlaku sygnałowym TGF- $\beta$ /SMAD oraz osi HIF-1 $\alpha$ /VEGF/ING-4 w przebiegu sarkoidozy- poszukiwanie nowych markerów diagnostycznych” stanowi oryginalne rozwiązanie przez Doktorantkę zagadnienia naukowego;
2. w przedstawionej do oceny rozprawie Pani Justyna Kiszalkiewicz wykazała dobrą wiedzę z zakresu biologii medycznej

3. oceniana dysertacja potwierdza umiejętności Doktorantki do prowadzenia pracy naukowo-badawczej

Przedstawiona przez Doktorantkę dysertacja odpowiada kryteriom wynikającym z ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym.

Uzasadnienie mojej oceny przedstawiają poniższe uwagi i spostrzeżenia merytoryczne dotyczące tej dysertacji.

#### **Formalna ocena rozprawy.**

Recenzowana rozprawa zawiera 167 stron tekstu. W tym wykaz skrótów i symboli stosowanych w pracy (6 str.), wprowadzenie-wstęp (36 str.), cele pracy (1 str.), materiał i metody (21 str.), najobszerniejszy-wyniki (43 str.), dyskusja i wnioski (11 str.), streszczenie w języku polskim (4 str.) i angielskim (3 str.), piśmiennictwo (19 str. 234 pozycje), spis rycin i tabel (7 str.) oraz wykaz dorobku i aktywności publikacyjnej Doktorantki (8 str., 14 publikacji i 47 doniesień zjazdowych). Piśmiennictwo jest dobrze dobrane. Cytowane są aktualne prace oraz kluczowe, starsze publikacje.

#### **Uwagi szczegółowe**

Sarkoidoza należy do rzadkich chorób o niewyjaśnionej etiologii. Wśród czynników ryzyka związanych z jej rozwojem, istotna, jak wskazują badania, jest osobnicza skłonność/podatność genetyczna, która uczuła osoby podatne eksponowane na nieznanne ciągle czynniki środowiskowe, do rozwoju choroby. W ostatnich latach dokonuje się przełom w coraz lepszym rozumieniu biologicznej roli niekodujących RNA. Znamy coraz więcej przykładów związku zaburzeń ekspresji mikroRNA z występowaniem różnych chorób u ludzi. Analiza zmian w regulacji szlaków komórkowych i rolę mikroRNA w regulacji ekspresji genów tych szlaków jest obecnie szeroko badana w uwarunkowaniu i rozwoju wielu chorób u ludzi, i jak wskazują wyniki dotychczasowych badań regulacja ekspresji genów docelowych za pomocą mikroRNA pełni istotną rolę w patogenezie wielu chorób.

Próba znalezienia nowych ścieżek sygnałowych, regulacji epigenetycznej ekspresji genów tych ścieżek, między innymi przez mikroRNA i mechanizmów komórkowych z tymi ścieżkami związanych z rozwojem sarkoidozy, choroby rzadkiej, jest istotnym kierunkiem badań naukowych, które mogą przyczynić się do identyfikacji genów/białek o potencjale

diagnostycznym/lub prognostycznym, i należą do ważnych zagadnień współczesnej nauki.

Dokonując oceny rozprawy należy podkreślić trafność wyboru jej tematu. Pani mgr Justyna Kiszalkiewicz, postanowiła zbadać ekspresję niektórych klas mikroRNA i ich genów docelowych, które są składowymi dwóch ważnych szlaków sygnałowych w komórkach, które jak sugerują nieliczne prace badawcze, są istotne w przebiegu sarkoidozy. Miały one charakter badań podstawowych, dostarczających nowych informacji dotyczących poziomu ekspresji wybranych genów i mikro RNA jak również potencjalnie aplikacyjny, poprzez poszukiwanie biomarkerów diagnostycznych o wartości różnicującej lub/i prognostycznej u chorych ze zdiagnozowaną sarkoidozą układu oddechowego.

Na początku wstępu Doktorantka przedstawia krótki rys sarkoidozy i jej rozpoznania i dokładnie opisuje sarkoidozę układu oddechowego, jej epidemiologię, etiopatogenezę i rozważane przez badaczy możliwe czynniki i mechanizmy patogenne związane z jej rozwojem. Ten fragment zawiera dwa jasne i dobrze dobrane schematy. Następnie Doktorantka omawia zmiany genomowe obserwowane w tej chorobie. Bardzo dużo powiązanych ze sobą informacji zamieściła doktorantka w analizie szlaków sygnałowych i ich znaczeniu w sarkoidozie oraz roli mikro RNA w procesach patologicznych w płucu, ich roli jako markerów chorób dróg oddechowych i ich znaczeniu w sarkoidozie. Wszystkie podrozdziały wstępu są logicznie powiązane ze sobą, a lektura tej części pracy doktorskiej pokazuje dużą wiedzę doktorantki, która zebrała aktualną wiedzę na ten temat i pozwala czytelnikowi poznać podstawowe fakty dotyczące sarkoidozy, szlaków sygnałowych, profil ekspresji ich genów składowych oraz mikro RNA w chorobach płuc i w sarkoidozie.

Jakkolwiek cały szereg informacji związanych z rozwojem i progresją choroby można znaleźć w literaturze dotyczącej sarkoidozy dróg oddechowych ciągle nie zostały znalezione markery pozwalające na zdiagnozowanie choroby i/lub pozwalające na określenie jej stopnia zaawansowania i prognozowania remisji. Stąd tematyka pracy doktorskiej, którą podjęła Pani mgr Justyna Kiszalkiewicz. Praca powstała w Zakładzie Molekularnych Podstaw Medycyny I Katedry Chorób Wewnętrznych Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi kierowanym przez prof. dr hab. n. med. Ewę Brzeziąską-Lasota, będącą również promotorem rozprawy.

W najobszerniejszej części dysertacji „Wyniki” niewątpliwym atutem jest wykorzystanie przez doktorantkę nowoczesnych technik badawczych. Godny uznania jest zakres eksperymentów i jakość ich wykonania. Doktorantka przedstawia wyniki badań

dotyczących wytypowanych dwóch szlaków sygnałowych i ich genów, które mogłyby być biomarkerami pomocnymi w różnicowaniu/lub prognozowaniu u chorych ze zdiagnozowaną sarkoidozą układu oddechowego. Badała względną ekspresję wytypowanych genów i kodowanych przez nie białek szlaku sygnałowego TGF- $\beta$ /SMAD i szlaku HIF-1 $\alpha$ /VEGF-A/ING4 i panelu 10 mikroRNA w grupie chorych na sarkoidozę i grupie kontrolnej w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej i komórkach popłuczyn oskrzelowo-płucnych. Analizowała statyczną istotność obserwowanych różnic w ich ekspresji, ale co jest bardzo ważne analizowała ekspresję genów i białek przez nie kodowanych z wieloma parametrami klinicznymi i biochemicznymi używanymi w diagnostyce sarkoidozy płucnej. Analizy wieloczynnikowe uwzględniające wiek, płeć, stopień zaawansowania RTG i parametry kliniczne oceniające funkcje czynnościowe układu oddechowego sugerują, że wybrane mikroRNA są związane z patogenezą choroby. Ekspresja w badanym materiale klinicznym wybranych białek wykazała na istotną rolę badanych szlaków sygnałowych w patogenezie sarkoidozy, a dwa z nich TGF- $\beta$  w nadsączu BAL i SMAD2 w surowicy wydają się mieć potencjalną wartość jako obiecujące markery o negatywnej wartości prognostycznej. Demonstracja tego rozdziału, zastosowanych metod i analiz wieloskładnikowych są dowodem na bardzo dobre opanowanie warsztatu badawczego przez doktorantkę. Uzyskane dane przedstawione są na 57 rycinach i w 37 tabelach.

Wyniki swoich badań Doktorantka omówiła w dyskusji konfrontując je z danymi z piśmiennictwa. Dyskusja jest interesująca i na wysokim poziomie merytorycznym. W „Dyskusji” mgr. Justyna Kiszalkiewicz przeanalizowała znaczenie obserwowanych zmian w ekspresji badanych genów i kodowanych przez nie białek oraz zmienionych poziomów mikroRNA w kontekście parametrów klinicznych i możliwej ich użyteczności jako markerów sarkoidozy, ze szczególnym uwzględnieniem ich możliwej aplikacyjnej wartości jako potencjalnych biomarkerów. Dyskusja przeprowadzona jest w sposób systematyczny. Wyniki własnych badań są oceniane w odniesieniu do danych z piśmiennictwa co świadczy o znajomości zagadnienia i dużej rzetelności naukowej.

Z bardzo dużej ilości danych doświadczalnych i ich wieloczynnikowej analizy statystycznej Doktorantka sformułowała wnioski, które są adekwatne i uzasadnione wynikami.

**Z obowiązku recenzenta poniżej załączam listę niewielu uwag:**

1. Streszczenie w języku polskim jest zbyt obszerne (ponad 3 str.) i zawiera niepotrzebne szczegóły, które są omówione w odpowiednich częściach dysertacji.
2. W bardzo szczegółowym opisie procedur, w szczególności dotyczących poziomu ekspresji genów oraz klas mikroRNA nie podano jaki był współczynnik sukcesu analizy ekspresji (czy były, a jeżeli tak jaka była liczba próbek wykluczonych, czy założono jakiś próg odcięcia dla jakości próbek).
3. Liczba rycin i tabel jest bardzo duża, może warto by połączyć je kiedy dotyczą tego samego genu czy miRNA w określonym materiale badawczym, kiedy dotyczą tego samego szlaku sygnałowego. Bardzo trudno jest porównywać szczególnie ryciny i tabele ze względu na ich liczbę.
4. Kilka błędów dotyczących wartości RQ jak np. na str.93, 0,0,25 (o jeden przecinek za dużo) i dalej 0.89- w porównaniu z tabelą 27 na następnej stronie, jedno zero za mało.
5. Str.99 tabela 32. Dlaczego białko VEGF-A było analizowane względem współczynnika Tiffeneau tylko dla chorych z ostrą postacią choroby? Czy inne parametry nie były analizowane, a jeżeli tak to dlaczego?
6. W podpisie Tabeli 35 jest: analiza ekspresji badanych genów w komórkach .. a powinno być analiza ekspresji badanych miRNA,
7. Tabela 3 podaje pełny zestaw klinicznej i biochemicznej charakterystyki pacjentów. W kilku Tabelach np. Tabela 38 - *"zaobserwowano także istotne statystycznie korelacje pomiędzy poziomem ekspresji badanych miRNA, a wybranymi parametrami: cechami biologicznymi chorych , parametrami czynnościowymi płuc czy markerami biochemicznymi (tabela 38)"* - czy Tabela 32- *tytuł: Korelacje pomiędzy poziomem immunoekspresji wybranych białek oraz wybranych parametrów w surowicy"* - analizowano jedno białko i jeden parametr. Jakiego względu przesądzały znaczne różnice w zestawie stosowanych do analizy parametrów charakteryzujących klinicznie i biochemicznie pacjentów.
8. Str 83 w opisie Ryc.27 i 28 Doktorantka podała wartość  $P=0.00001$ . Programy statystyczne podają takie wartości P, które nic nie wnoszą poza „oszołomieniem czytającego”, a coraz powszechniejsza zasada, że zostawia się wartość  $P =0.001$ , która

i tak świadczy o wysokiej istotności różnicy pomiędzy grupami, nawet przy tak wysokich P jak podała Doktorantka, ale jest to temat do dyskusji.

9. Str.97 liczebność grup

10. Drobne uchybienia natury edytorskiej, jak rozwinięcie INF-γ jako INF alfa, literówki, styl i sporo sformułowań angielskojęzycznych używanych powszechnie w laboratoriach ale mających dobre i w miarę krótkie polskie zamienniki, brak konsekwencji z zapisie miRNA np. miRlet7f i miR-let-7f, miR 130 jest raz pisany jako 130a innym razem jako miR130, często Doktorantka zamiast *istotne statystyczne różnice* pisze *istotnie statystycznie różnice*. Tego typu drobnych uchybień edytorskich jak i stylistycznych jest szczególnie dużo w Dyskusji.

Pomimo szeregu uwag nie zmniejszają one wartości merytorycznej przeprowadzonych badań, ich analizy jak i wnioskowania. Większość uwag ma charakter edytorski. Reasumując mogę stwierdzić, że praca doktorska pani mgr Justyny Kiszalkiewicz dotyczy ważnego problemu poszukiwania markerów diagnostycznych u chorych ze zdiagnozowaną sarkoidozą. Możliwość praktycznego zastosowania wyników pracy poprzez wytypowanie potencjalnych biomarkerów diagnostycznych potwierdza ważkość tej pracy.

Dorobek naukowy Pani mgr Justyny Kiszalkiewicz jest imponujący. Pani mgr Justyna Kiszalkiewicz jest pierwszą autorką trzech prac publikujących część wyników badań przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej, ściśle powiązanych z tematyką rozprawy, i współautorką w pozostałych jedenastu pracach. Trzydzieści z 14 prac zostały opublikowane w czasopismach recenzowanych o zasięgu międzynarodowym, a ich wskaźnik IF wynosi 31,57, a punktacja MNiSW 348 punktów. Jest również pierwszą lub współautorką 47 doniesień prezentowanych na licznych konferencjach studenckich, krajowych i międzynarodowych.

W podsumowaniu, pragnę pogratulować Doktorantce opanowania doskonałego warsztatu i ciekawych, istotnych wyników. Merytoryczna strona pracy zasługuje na uznanie i nie budzi zastrzeżeń. Chciałabym podkreślić istotny dorobek naukowy mgr Justyny Kiszalkiewicz, a fakt, że Doktorantka jest pierwszym autorem trzech publikacji, w tym dwóch o zasięgu międzynarodowym świadczy o jej samodzielności i dużej znajomości badanych przez nią zagadnień oraz wagi badanego problemu. Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że recenzowana przeze mnie dysertacja spełnia ustawowe (*art.13 ustawy z dn. 14 marca 2013 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki –Dz. U. z*

2003r. nr65, poz.595; z późn. zm. zwanej dalej Ustawą) i zwyczajowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie mgr Justyny Kiszalkiewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie ze względu na wartość pracy oraz na imponujący dorobek publikacyjny Doktorantki, który obejmuje również częściowe wyniki pracy doktorskiej, **wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Justyny Kiszalkiewicz.**

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'J. Kiszalkiewicz', written in a cursive style.

