

Prof. dr hab. n. med. Mirosław Bik-Multanowski
Kierownik Zakładu Genetyki Medycznej
Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum
Ul. Wielicka 265, 30-663 Kraków

Kraków, 27.07.2022

Recenzja pracy doktorskiej

Lek. med. Lidii Suchoń

„Ocena znaczenia klinicznego, wykrywanego w badaniach przesiewowych noworodków w populacji polskiej, deficytu biotynidazy wraz z próbą określenia korelacji genotyp-fenotyp”

Deficyt biotynidazy to jedna z chorób należących do rosnącej grupy bardzo rzadkich, wrodzonych błędów metabolizmu, które stwarzają spore problemy diagnostyczne, ale coraz częściej mogą być leczone z dobrym skutkiem. W konsekwencji badania dotyczące patogenezy, optymalizacji diagnostyki i nowych metod leczenia tych chorób są ważne z punktu widzenia poznawczego i klinicznego, zwłaszcza w dobie medycyny personalizowanej.

Niedobór aktywności biotynidazy dziedziczony jest w sposób autosomalny recesywny i występuje w przypadku obecności dwóch mutacji genu *BTD*. Osoby, które zostały zdiagnozowane odpowiednio wcześniej (np. w ramach przesiewu noworodkowego) i rozpoczęły leczenie zanim pojawiły się u nich objawy, rozwijają się zazwyczaj prawidłowo. Poważne problemy kliniczne dotyczą natomiast chorych, u których objawy pojawiły się (często w formie nawracającej) przed wdrożeniem leczenia biotyną. U nieleczonych małych dzieci z głębokim niedoborem aktywności biotynidazy mogą wystąpić ciężkie nieprawidłowości neurologiczne, w tym drgawki, hipotonia mięśniowa, ataksja, utrata słuchu i problemy ze wzrokiem. W konsekwencji u pacjentów tych często występuje opóźnienie rozwoju. Typowe są również objawy skórne, takie jak np. łysienie, uciążliwe wysypki i kandydoza. Pacjenci z częściowym niedoborem biotynidazy mają zazwyczaj łżejsze objawy. Starsze dzieci i młodzież z głębokim niedoborem biotynidazy często wykazują niedowład spastyczny i obniżoną ostrość

wzroku. Gdy u pacjenta wystąpią problemy ze wzrokiem, utrata słuchu i opóźnienie rozwoju, są one zwykle nieodwracalne, nawet przy terapii biotyną.

Przekazana mi do recenzji rozprawa na stopień doktora nauk medycznych została zrealizowana w Klinice Chorób Metabolicznych i Pediatrii Instytutu Matki i Dziecka w Warszawie pod kierunkiem dr hab. n. med. Jolanty Sykut-Cegielskiej, prof. IMiD.

W badaniach będących podstawą dysertacji Doktorantka zebrała dane kliniczne i laboratoryjne uzyskane w ramach procedury diagnostycznej u pacjentów z podejrzeniem niedoboru biotynidazy, diagnozowanych w ośrodkach pediatrii metabolicznej w Polsce. Omawiana rozprawa doktorska jest odzwierciedleniem wiodącej roli Instytutu Matki i Dziecka jako ośrodka diagnostyki i leczenia dzieci z wrodzonymi błędami metabolizmu i osobistej roli Promotora pracy jako autorytetu pediatrii metabolicznej w naszym kraju.

Doktorantka podjęła się ustalenia korelacji genotyp-fenotyp u polskich pacjentów z badaną chorobą. Korelacja genotyp-fenotyp w deficycie biotynidazy to zagadnienie nie do końca poznane. Wiadomo, że delecje, insercje lub warianty typu *nonsense*, w przypadku obecności w obu allelach odpowiedzialnego za chorobę genu *BTD*, zwykle skutkują całkowitym brakiem aktywności enzymatycznej biotynidazy. Z kolei warianty zmiany sensu mogą, ale nie muszą, skutkować całkowitą utratą aktywności tego enzymu. W każdej populacji zdarzają się jednak mutacje dla niej specyficzne, w tym tzw. mutacje prywatne, występujące w jednej rodzinie, co ogranicza przydatność danych dostępnych w piśmiennictwie i wymusza prowadzenie badań w konkretnej populacji. W tym kontekście przedstawiona mi do recenzji praca posiada istotne walory naukowe, po raz pierwszy w Polsce zajmując się powyższym zagadnieniem. Dodatkowe efekty pracy – przeprowadzenie charakterystyki klinicznej polskiej populacji dzieci z niedoborem biotynidazy oraz opracowanie algorytmu postępowania w przypadku uzyskania nieprawidłowego wyniku badania przesiewowego – mają natomiast wartość praktyczną, porządkując dane dotyczące polskiej populacji chorych.

Recenzowana rozprawa doktorska ma charakter monografii o klasycznej budowie i objętości. Praca obejmuje 111 stron, została bardzo starannie przygotowana pod względem edytorskim i wydana w formie książkowej. Posiada typowy układ stosowany w rozprawach doktorskich z podziałem na: wstęp, cele pracy, materiał i metody, wyniki i dyskusję, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz piśmiennictwo. Dodatkowo zawiera rekomendacje Autorki dotyczące postępowania diagnostycznego przy podejrzeniu deficytu biotynidazy.

W pierwszym podrozdziale wstępu Autorka w sposób wyczerpujący przedstawiła fizjologiczną rolę biotyny i biotynidazy oraz molekularną patogenezę niedoboru aktywności tego enzymu. Mam do tej części dwie drobne uwagi – nie do końca jasne jest czy na stronie 9 w zamieszczonym opisie genu *BTD* chodzi o miejsca inicjacji transkrypcji czy translacji oraz jaki typ mutacji odpowiada słowu „biallelic” użytemu na stronie 10 w opisie wariantów powodujących głęboki deficyt biotynidazy.

W kolejnym podrozdziale wstępu szczegółowo opisano kliniczne postaci deficytu biotynidazy. Następnie przedstawiono aktualnie stosowany algorytm diagnostyczny. Pozwolę sobie tutaj na pewien komentarz – oczywiście przedstawiony algorytm jest prawidłowy, jednak aktualnie coraz częściej zamiast stosować klasyczne sekwencjonowanie, aby po kolei poszukiwać wybranych mutacji w kolejnych fragmentach genu, od razu „odczytuje” się cały gen metodą sekwencjonowania następnej generacji (NGS). Takie podejście wynika oczywiście ze zwiększającej się dostępności, a zwłaszcza spadku kosztów powyższej diagnostyki.

Osobną kwestią jest przydatność sekwencjonowania całego genomu w diagnostyce niedoboru biotynidazy. Problemem jest tutaj brak uniwersalnych algorytmów oceny znaczenia zidentyfikowanych, „głęboko intronowych” wariantów genowych. Takie warianty można znaleźć bardzo często a nasza wiedza niestety nie pozwala jeszcze na zautomatyzowanie oceny ich znaczenia. W efekcie w przypadku sekwencjonowania całego genomu poruszamy się ciągle na pograniczu diagnostyki i badań podstawowych.

W kolejnej części wstępu Autorka przedstawiła częstość występowania deficytu biotynidazy na świecie, pozycjonując w tym kontekście Polskę. Zwracają uwagę spore rozbieżności pomiędzy poszczególnymi krajami Europy i sąsiadującymi ze sobą populacjami. W tym kontekście badania podjęte przez Doktorantkę w populacji polskiej wydają się szczególnie istotne.

Ostatni podrozdział pierwszej części pracy dotyczy leczenia deficytu biotynidazy. Zawiera przydatne informacje praktyczne, przedstawione w przejrzysty sposób.

Podsumowując – „Wstęp” jest kompletnym opisem aktualnego stanu wiedzy w zakresie deficytu biotynidazy, zawierającym dużo informacji praktycznych, potencjalnie przydatnym pediatrom i neonatologom, którzy najczęściej mają do czynienia z wrodzonymi błędami metabolizmu.

„Cele pracy” zostały sformułowane w sposób jasny, konkretny i odpowiadają potencjałowi danych klinicznych i laboratoryjnych, które Autorka zdecydowała się przeanalizować.

W odniesieniu do treści rozdziału „Materiał i metody” na uwagę zasługuje kontrast pomiędzy liczebnością analizowanej populacji (ponad milion noworodków przebadanych w Polsce w okresie 2016-2020 przy pomocy testu przesiewowego) a ostateczną wielkością grupy, w której podejrzewano deficyt biotynidazy i w której przeprowadzono diagnostykę weryfikującą rozpoznanie – 22 dzieci. Kontrast pomiędzy oboma liczbami uzmysławia skalę trudności i środków, które należy zaangażować w przypadku diagnostyki wrodzonych błędów metabolizmu aby zapewnić wczesne wykrycie danej choroby i zachować możliwości udzielenia efektywnej pomocy medycznej pacjentom.

Jak już wspomniano, materiał do badań był zbierany przez około 5 lat. Dane kliniczne dotyczyły pacjentów z poradni w całej Polsce a dane laboratoryjne uzyskano przy współpracy Zakładu Badań Przesiewowych Instytutu Matki i Dziecka oraz Centrum Medycznego Medgen w Warszawie. Praca ma charakter retrospektywnej analizy danych.

Pewnego komentarza wymaga moim zdaniem wspomniany w opisie metodyki opcja wykonywania badań molekularnych u rodziców badanych dzieci – nosicieli choroby. Taka praktyka jest popularna, jednak nie zawsze potrzebna z uwagi na jasny sposób dziedziczenia deficytu biotynidazy.

W pierwszej części rozdziału „Wyniki” podano charakterystykę badanej grupy dzieci. Zastanawiający jest fakt występowania niedoboru biotynidazy głównie na wschodzie i południu Polski, podczas gdy w analizowanym okresie nie odnotowano żadnych przypadków tej choroby w Polsce północno-zachodniej. Ponieważ jednak badania przesiewowe noworodków wykonywane są w Instytucie Matki i Dziecka dla terenu całej Polski (z pewnymi wyjątkami w odniesieniu do województwa zachodniopomorskiego), być może odpowiedzialna za taką sytuację jest bardzo niska częstość deficytu biotynidazy i regionalne fluktuacje częstości tej choroby. Kolejnym interesującym faktem, być może wymagającym weryfikacji, jest znaczny odsetek wcześniaków z jednego regionu Polski w badanej grupie – aż troje dzieci, u których ostatecznie nie potwierdzono deficytu biotynidazy urodziło się w województwie lubelskim.

Wyniki badań biochemicznych stosowanych w procesie diagnostycznym deficytu biotynidazy zostały przedstawione w kompleksowy sposób. Warto podkreślić odnotowaną przez Doktorantkę małą przydatność diagnostyczną badania profilu acylokarnityn metodą tandemowej spektrometrii mas. Bardzo dokładnie opisane zostały wyniki badań molekularnych. Jako metodę diagnostyczną zastosowano klasyczne sekwencjonowanie genu *BTD*. Należy zauważyć, że u jednego z chorych dzieci nie zidentyfikowano drugiej mutacji odpowiedzialnej za wystąpienie choroby. Nasuwa się pytanie czy nie warto by rozważyć dodatkowego badania (np. techniką MLPA), w celu wykluczenia obecności ewentualnej delecji, zbyt dużej, aby mogła zostać wykryta poprzez sekwencjonowanie metodą Sangera. Analogiczna sytuacja może dotyczyć któregoś z siedmiu kolejnych pacjentów, u których za drugą mutację genu *BTD* przyjęto zidentyfikowany wariant p.Asp444His. Co prawda wcześniejsze badania (w tym prace prowadzone przez Promotora omawianej dysertacji) potwierdziły przyczynową rolę zmiany aminokwasu w pozycji 444 w występowaniu częściowego niedoboru biotynidazy, jednak obecność tego wariantu skutkuje jedynie niewielkim obniżeniem aktywności enzymu i może nie tłumaczyć nasilenia objawów chorobowych u wszystkich spośród wspomnianych siedmiu pacjentów.

W dalszej części rozdziału „Wyniki” przedstawiono bardzo ciekawe dane kliniczne dotyczące pacjentów z głębokim i częściowym deficytem biotynidazy. Wszystkie przedstawione w tej części pracy opisy kliniczne podnoszą wartość dysertacji, jednak szczególnie interesujące z praktycznego punktu widzenia wydają mi się dane dotyczące dzieci, u których ostatecznie wykluczono deficyt biotynidazy, niemniej wcześniej stwierdzano nieprawidłowości w badaniu GC/MS moczu. Nieprawidłowości w badaniu GC/MS często pojawiają się jako przygodne znalezisko u młodych niemowląt hospitalizowanych na oddziałach pediatrycznych, stwarzając trudności diagnostyczne neonatologom i pediatrom opiekującym się najmłodszymi pacjentami. Dokładne opracowanie tego zagadnienia wykracza oczywiście poza ramy przedstawionej dysertacji, jednak być może mogłoby być tematem kolejnych prac Doktorantki.

W prawidłowo poprowadzonej dyskusji Autorka odniosła uzyskane wyniki do danych z piśmiennictwa. Podkreśliła trudności diagnostyczne pojawiające się przy zastosowaniu jakościowych metod biochemicznych, zwłaszcza w okresie noworodkowym i u wcześniaków, oraz małą przydatność analizy profilu acylokarnityn i profilu kwasów organicznych w moczu w procesie weryfikacji wyników testów

przesiewowych. Ciekawie i w dokładny sposób przeanalizowała spektrum wykrytych w polskiej populacji wariantów genowych i korelację genotyp-fenotyp u badanych pacjentów. Sporo uwagi Doktorantka poświęciła sprawiającemu pewne trudności interpretacyjne, wspomnianemu już wcześniej wariantowi p.Asp444His genu *BTD*.

Dosyć nieoczekiwanie, w przedstawionej dysertacji rozdział „Dyskusja” zawiera również sporą ilość danych oryginalnych, przedstawionych w tabeli 8 i na rycinie 4. Wydaje się, że w większości można by je umieścić w rozdziale „Wyniki”, chociaż trzeba przyznać, że zestawienie w tabeli 8 danych dotyczących analizowanych pacjentów z danymi z piśmiennictwa ułatwia śledzenie dyskusji.

Należy zgodzić się z ważnymi uwagami Doktorantki dotyczącymi komfortu emocjonalnego rodziców dzieci, u których wysunięto podejrzenie deficytu biotynidazy i ostatecznie, po długotrwałej diagnostyce, deficyt wykluczono. Podobny problem był podnoszony w trakcie wprowadzania w Polsce badań przesiewowych w kierunku mukowiscydozy. Należy zgodzić się z Autorką, że pewnym rozwiązaniem byłoby tu wprowadzenie do rutynowego stosowania, w charakterze „*second tier test*” molekularnej analizy genu *BTD* w oparciu o materiał pozostały na bibule przesiewowej po wykonaniu testów biochemicznych.

Wnioski, będące podsumowaniem pracy są sformułowane ostrożnie i zawierają przydatne wskazówki kliniczne, istotne zwłaszcza w diagnostyce i leczeniu niemowląt. Rozdział zawierający zalecenia dotyczące postępowania w przypadku uzyskania nieprawidłowego wyniku badania przesiewowego stanowi rozwinięcie rozdziału „Wnioski”, a jego zamieszczenie w pracy wydaje się celowe ze względu na wartość praktyczną.

Piśmiennictwo w przedstawionej dysertacji obejmuje 155 pozycji głównie z czasopism anglojęzycznych, jest aktualne i adekwatnie cytowane.

Na uwagę zasługuje dbałość Doktorantki o merytoryczną spójność i ścisłość prezentowanych danych – po wykryciu drobnej pomyłki w nazwie jednej ze współpracujących poradni metabolicznych Autorka przygotowała erratę, skutecznie korygując nieprawidłową informację i podnosząc wartość swojej pracy.

Na koniec chciałbym podkreślić potencjalną wartość dydaktyczną przedstawionej dysertacji, której główne treści w moim odczuciu powinny zostać opublikowane w szeroko dostępnym polskim czasopiśmie z dziedziny pediatrii i w ten sposób przyczynić

się do uporządkowania wiedzy lekarzy zainteresowanych diagnostyką i leczeniem wrodzonych błędów metabolizmu.

Podsumowując, nie mam większych uwag do przedstawionej mi rozprawy doktorskiej. Dostępne dane zostały kompleksowo przeanalizowane a całość napisana z dbałością o szczegółowe przedstawienie problemu i dobre udokumentowanie uzyskanych wyników. Autorka wykazała się szeroką i transdyscyplinarną wiedzą w dziedzinie wrodzonych błędów metabolizmu. Przedstawiona praca pokazuje również ewidentną potrzebę działań wielośrodkowych, stanowiących jedyny sposób wypracowania rekomendacji diagnostycznych i leczniczych u pacjentów z chorobami rzadkimi.

Przedstawioną mi do recenzji dysertację oceniam wysoko. Spełnia ona w moim odczuciu wymogi stawiane rozprawom doktorskim w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2017 poz. 1789) i kwalifikuje lek. med. Lidię Suchoń do nadania stopnia doktora nauk medycznych. Zwracam się zatem do Rady Naukowej Instytutu Matki i Dziecka w Warszawie o dopuszczenie lek. med. Lidii Suchoń do dalszych etapów przewodu doktorskiego i publicznej obrony dysertacji.

Prof. dr hab. Mirosław Bik-Multanowski
Specjalista pediatrii, kardiologii i klinicznej
pediatrii metabolicznej
i laboratoryjnej genetyki medycznej
PWZ 1184771, FWZDL 09422, tel. 602555131

Prof. dr hab. n. med. Mirosław Bik-Multanowski