



Instytut „Centrum Zdrowia Matki Polki”

Zakład Genetyki

93-338 Łódź; ul. Rzgowska 281/289

tel.: (0-42) 271-12-71; genetyka@iczmp.edu.pl

Łódź, 22.07.2022

**Recenzja rozprawy na stopień doktora nauk medycznych
mgr Katarzyny Kowalczyk**

p.t. „Ocena przydatności metody porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy CGH do poszukiwania genetycznych przyczyn wrodzonych wad rozwojowych u płodów”

Promotor: prof. dr hab. n. med. Jerzy Bał

Promotor pomocniczy: dr hab. n. med. Beata Nowakowska prof. IMiD

Wrodzone wady rozwojowe są istotnym problemem klinicznym, który dotyczy około 2% żywo urodzonych noworodków, a także znacznego odsetka ciąż obumarłych. Choć etiologia wad wrodzonych może być złożona, wiodącą przyczyną są czynniki genetyczne, w tym aberracje chromosomowe. Badania metodą mikromacierzy aCGH stały się potężnym, nowoczesnym narzędziem do analizy genomu o wysokiej rozdzielczości i wykrywania zmiany liczby kopii (CNV). Wprowadzenie aCGH do rutynowej diagnostyki prenatalnej rozpoczęło nową erę, w której z jednej strony zapewniamy pacjentom diagnostykę niezrównoważeń genomu z rozdzielczością nieosiągalną metodami cytogenetyki klasycznej, a z drugiej mierzymy się z trudnościami interpretacyjnymi i decyzjami co do zakresu przekazywanej pacjentom informacji. Konsekwencje kliniczne dużej grupy identyfikowanych metodą aCGH aberracji są trudne do zdefiniowania. Ważnym zagadnieniem jest więc interpretacja nowych wariantów w powiązaniu z określonym fenotypem i rozpowszechnianie tych danych w publikacjach i w dedykowanych ogólnodostępnych bazach.

Recenzowana rozprawa doktorska oparta o cykl czterech prac jest poświęcona ocenie submikroskopowych niezrównoważeń genomu identyfikowanych metodą aCGH w ramach diagnostyki prenatalnej wad wrodzonych oraz diagnostyki poronień. Rosnąca dostępność badania, rekomendacje towarzystw naukowych wskazujące potrzebę rutynowego stosowania badań metodą mikromacierzy aCGH w przypadku podejrzenia wad anatomicznych u płodu, a z drugiej strony częste trudności w interpretacji zidentyfikowanych zmian sprawiają, że podjęty przez Doktorantkę temat jest bardzo aktualny i potrzebny w praktyce klinicznej.

Rozprawa doktorska liczy 126 stron i obejmuje: wykaz stosowanych skrótów, wykaz publikacji stanowiących pracę doktorską, opis w języku polskim i w języku angielskim, kopie prac wchodzących w skład cyklu, opinie wydane przez Komisję Bioetyczną Instytutu Matki i Dziecka oraz oświadczenia o charakterze udziału współautorów publikacji.

W skład rozprawy wchodzi cztery publikacje w tym trzy publikacje oryginalne i jeden opis przypadku. Pierwsza publikacja oryginalna została opublikowana w 2021 roku w czasopiśmie ze współczynnikiem oddziaływania IF wynoszącym 4,096 (100 punktów MNiSW), kolejne dwie w 2022 r. w czasopismach z IF=3,412 (100 punktów MNiSW) oraz IF=4,096 (100 punktów MNiSW), natomiast opis przypadku został opublikowany w 2020 r. w czasopiśmie z IF=4,438 (100 punktów MNiSW). Łączna wartość IF publikacji wchodzących w skład niniejszej rozprawy wynosi 16,042 (400 punktów MNiSW). Publikacje są opracowaniami zbiorowymi, w trzech z nich Doktorantka jest pierwszy autorem. Wkład Doktorantki w przygotowanie publikacji oryginalnych został określony jako 70%, 50% i 50%, a dla opisu przypadku jako 8%, co zostało potwierdzone w oświadczeniach współautorów, zawartych na końcu rozprawy.

W odniesieniu do prac oryginalnych, Doktorantka stworzyła projekt badania, przeprowadziła badania laboratoryjne i dokonała analizy i interpretacji wyników, odegrała także główną rolę w opracowaniu manuskryptów do publikacji. Udział Doktorantki w publikacji będącej opisem przypadku jest znacznie skromniejszy i choć ważny z diagnostycznego punktu widzenia, to znacznie trudniejszy do oceny w aspekcie pracy naukowej.

W publikacji numer 1 Doktorantka przedstawia wyniki zastosowania metody aCGH w identyfikacji aberracji chromosomowych z poronień nawracających. Analizie poddano 62 próbki. Dodatkowo, w celu wykluczenia obecności poliploidii chromosomowej u płodu płci żeńskiej, w 22 przypadkach przeprowadzono badanie cytogenetyczne metodą Rapid-FISH. Nieprawidłowe wyniki badania metodą aCGH uzyskano w 35 próbkach czyli ponad połowie przypadków. Największy odsetek stwierdzonych nieprawidłowości stanowiły trisomie chromosomów autosomalnych, następnie poliploidia i aberracje strukturalne. Charakter patogeny submikroskopowych niezrównoważeń stwierdzono w 3 przypadkach, a w trzech kolejnych aberracje określono jako prawdopodobnie patogenne.

Należy podkreślić, że powyższa praca była realizowana w ramach grantu Doktorantki wyłonionego w konkursie Preludium 12 Narodowego Centrum Nauki.

W publikacji numer 2 Doktorantka przedstawia wyniki zastosowania macierzy aCGH w diagnostyce prenatalnej u 484 płodów z rozpoznanymi ultrasonograficznie wrodzonymi wadami serca. Do badania włączono 256 płodów z izolowanymi wadami i 228 płodów z wadami serca współistniejącymi z innymi wadami rozwojowymi. Aberracje chromosomowe stwierdzono w 176 przypadkach, w tym u 74 płodów z izolowaną wadą serca i u 102 płodów z współistniejącymi innymi wadami rozwojowymi. Najczęściej stwierdzane były aneuploidie (58%). Spośród aberracji strukturalnych 22 zakwalifikowano jako patogenne, a 18 jako potencjalnie patogenne. U 9 płodów stwierdzono obecność zmian o niepewnym znaczeniu

klinicznym. W pracy Doktorantka dokonuje także analizy rodzajów wad serca w aspekcie zidentyfikowanej aberracji chromosomowej.

W publikacji numer 3 przedstawiono opis przypadku prenatalnego. U płodu na podstawie obrazu ultrasonograficznego postawiono rozpoznanie sekwencji deformacyjnej akinezji płodu (FADS). Badanie metodą aCGH wykazało obecność delecji obejmującej eksony 3-36 genu *AGRN*. Analizę poszerzono o badanie WES, które wykazało obecność delecji jednego nukleotydu w eksonie 27 genu *AGRN*. Opisany przypadek jest najprawdopodobniej pierwszym opublikowanym doniesieniem o obecności patogenicznego wariantu na obu allelach genu *AGRN* w zespole FADS.

Publikacja numer 4 podsumowuje doświadczenia Zakładu Genetyki Medycznej IMiD w diagnostyce prenatalnej z użyciem aCGH. Imponująca wielkość grupy badanej to 7400 ciąż poddanych badaniom inwazyjnym ze względu na szereg wskazań zgodnych z założeniami Programu Badań Prenatalnych. Ocenie poddano użyteczność macierzy w diagnostyce prenatalnej. Przedstawione wyniki badań dokumentują wysoką czułość metody aCGH w detekcji aberracji chromosomowych u płodów. Odsetek stwierdzonych nieprawidłowości wyniósł 27,2%, w tym 71,2% stanowiły liczbowe aberracje chromosomowe a 28,8% aberracje strukturalne. Istotnym elementem pracy jest zestawienie danych dotyczących wydajności metody CGH dla ciąż o różnych wskazaniach do diagnostyki inwazyjnej.

Wnioski uzyskane z powyższych prac potwierdzają zasadność sformułowanych przez Doktorantkę celów pracy. Wysoka skuteczność aCGH w identyfikacji niezrównoważeń genomu została potwierdzona zarówno w analizowanych wskazaniach w diagnostyce prenatalnej, jak i w diagnostyce przyczyn poronień. Zidentyfikowanie istotnych CNV w materiale pochodzenia płodowego nie tylko w przypadku podejrzenia wad rozwojowych u płodu, ale także w przypadkach zaawansowanego wieku matki czy nieprawidłowego wyniku testu PAPP-A, uzasadnia zastosowanie aCGH jako testu pierwszego wyboru w diagnostyce prenatalnej. Doktorantka wskazuje także, że ocena zależności genotypowo-fenotypowej niektórych CNV, w szczególności tych o niepewnym znaczeniu klinicznym, jest trudna i nie zawsze możliwa.

Metodyka i wyniki zawarte w publikacjach zostały ocenione już przez recenzentów czasopism i merytorycznie nie budzą żadnych zastrzeżeń. W dobrze napisanym i zwięzłym komentarzu do publikacji Autorka rozprawy opisała tematykę, cele pracy, metodykę, wyniki i wnioski wynikające z prac oryginalnych składających się na cykl. Komentarz został opatrzony pięcioma pozycjami piśmiennictwa.

Najtrudniejszą kwestią w diagnostyce prenatalnej z użyciem aCGH pozostaje interpretacja zmian, w szczególności tych o niepewnym znaczeniu klinicznym. Powołując się na opublikowane w 2016 roku stanowisko Doktorantka wskazuje, że zmiany tego typu nie są umieszczane na wyniku diagnostycznym. W ostatnich latach ukazało się szereg publikacji, które są dedykowane właśnie problemowi zmian typu VOUS w praktyce klinicznej i wskazują różne, często odmienne strategie raportowania zmian. Prosiłabym Doktorantkę o odniesienie się w czasie obrony do argumentów za i przeciw raportowania zmian CNV o niepewnym znaczeniu klinicznym.

Na zakończenie recenzji chciałabym wyraźnie podkreślić, że rozprawę doktorską Pani mgr Katarzyny Kowalczyk oceniam bardzo wysoko. Praca dowodzi umiejętności stawiania problemów badawczych, organizacji warsztatu badawczego, czytelnego przedstawienia wyników badań i ich rzetelnej, krytycznej interpretacji. Uzyskane w toku realizacji pracy rezultaty mają istotne znaczenie dla nauki i praktyki klinicznej. Pragnę zauważyć, że wyniki rozprawy stanowią rzeczywisty wkład w rozwój wiedzy w reprezentowanej przez Doktorantkę dziedzinie badań.

Stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska autorstwa mgr Katarzyny Kowalczyk spełnia wszystkie warunki określone 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). W związku z tym mam zaszczyt wnieść przed Wysoką Radę Naukową Instytutu Matki i Dziecka wniosek o dopuszczenie Kandydatki do publicznej dyskusji nad rozprawą.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę dużą wartość naukową rozprawy doktorskiej oraz wysoką jakość opublikowanych prac będących elementami cyklu, potwierdzoną bardzo wysokim wskaźnikiem oddziaływania, wnioskuję o wyróżnienie pracy.

KIEROWNIK ZAKŁADU GENETYKI
Instytutu "Centrum Zdrowia Matki Polki"

dr hab. n. med. Agnieszka Gach
profesor Instytutu