

Katowice, dn. 29.08.2022

Dr hab. n. med. Ewa Jamroz
Górnośląskie Centrum Zdrowia Dziecka
im. Św. Jana Pawła II
Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny nr 6
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach
Oddział Pediatrii i Neurologii Wieku Rozwojowego
40-752 Katowice, ul. Medyków 16
tel: 32 207 16 00, fax: 32 207 16 15

Ocena

Rozprawy na stopień doktora nauk medycznych lek. med. Lidii Suchoń

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

Wrodzona wada metabolizmu stanowi genetycznie uwarunkowany defekt biochemiczny (blok metaboliczny), spowodowany deficytem aktywności enzymu katalizującego określoną reakcję. Bezpośrednią przyczyną błędu metabolicznego jest mutacja genu kodującego białko, będące produktem danego genu, co doprowadza do trwałego lub przejściowego zaburzenia równowagi biochemicznej organizmu. Lista znanych wrodzonych wad metabolizmu obejmuje ok. 2000 chorób o różnym modelu dziedziczenia i zróżnicowanym obrazie klinicznym, występujących w populacji z częstością <5:10000 urodzeń. Nie ma izolowanego objawu, którego obecność pozwoliłaby rozpoznać albo wykluczyć chorobę. Na każdym etapie od genotypu do fenotypu różne czynniki modyfikują ostateczny obraz kliniczny. Z uwagi na dużą różnorodność obrazu klinicznego ustalenie prawidłowego rozpoznania stanowi duże wyzwanie dla lekarzy, diagnostów i często prowadzi do tzw. „odysei diagnostycznej”, czyli uporczywej diagnostyki trwającej kilka a nawet kilkanaście lat. Wprowadzenie badań przesiewowych noworodków umożliwiło przedobjawowe rozpoznanie niektórych wrodzonych wad metabolizmu, a tym samym wczesne rozpoczęcie leczenia i poprawę rokowania. Metodą stosowaną w przesiewie jest tandemowa spektrometria mas (MS/MS), w której w „suchej” kropli krwi oznaczane są profile aminokwasów i acyklokarnityn. Dzięki tej metodzie w Polsce wykrywanych jest obecnie 26 wrodzonych wad metabolizmu. Przykładem tej grupy chorób,

wykrywanej w badaniach przesiewowych noworodków jest deficyt biotynidazy – zaburzenie metabolizmu biotyny. Choroby dziedziczy się w sposób autosomalny, recesywny. Przyczyną jest mutacja w genie *BTD*. Obraz kliniczny bardzo zróżnicowany, uwarunkowany jest aktywnością enzymu. Przebieg naturalny choroby jest postępujący, często prowadzi do niewydolności wielonarządowej i zgonu, w przypadku braku terapii polegającej na stałej suplementacji biotyny. Diagnostyka w kierunku deficytu biotynidazy wymaga zastosowania innych metod niż tandemowa spektrometria mas (MS/MS). Dlatego od marca 2016r. a w pełni od stycznia 2018r., w Polsce realizowany jest rozszerzony program badań przesiewowych noworodków z wykorzystaniem badań enzymatycznych i molekularnych.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa na tytuł doktora nauk medycznych lek. med. Lidii Suchoń dotyczy oceny znaczenia klinicznego, wykrywanego w badaniach przesiewowych noworodków w populacji polskiej, deficytu biotynidazy wraz z próbą określenia genotyp-fenotyp.

Temat, którego podjęła się Doktorantka uważam za istotny pod względem poznawczym i klinicznym, gdyż w sposób znaczący poszerza wiedzę dotyczącą genetycznie uwarunkowanych błędów metabolizmu, których przykładem jest deficyt biotynidazy.

Rozprawa doktorska została dobrze zaplanowana i napisana. Układ pracy jest zgodny z powszechnie przyjętymi zasadami redagowania prac naukowych. Jest zawarta na 111 stronach wydruku komputerowego w formacie A4. Składa się w kolejności z: spisu treści, wykazu skrótów używanych w pracy, wstępu, celu pracy, materiału i metodyki, części prezentującej wyniki, dyskusji, wniosków, zaleceń postępowania w przypadku uzyskania nieprawidłowego wyniku badania przesiewowego noworodków w kierunku deficytu biotynidazy oraz streszczenia w języku polskim i angielskim. Wykaz piśmiennictwa obejmuje 155 pozycji w większości obcojęzycznych. W tekście pracy zamieszczono 8 tabel i 4 ryciny.

Praca ma charakter analizy retrospektywnej. Wykonana została we współpracy z Zakładem Badań Przesiewowych i Diagnostyki Metabolicznej Instytutu Matki i Dziecka oraz Centrum Medycznym Medgen.

Wstęp liczy 16 stron. Został podzielony na 4 podrozdziały. Doktorantka szczegółowo omawia etiologię i patomechanizm deficytu biotynidazy, enzymu odgrywającego kluczową rolę w metabolizmie biotyny. Następnie przedstawia budowę biotyny i cykl jej przemian jako ważnego kofaktora enzymów biorących udział w procesie glukoneogenezy, metabolizmie tłuszczów, oraz katabolizmie aminokwasów, a także jako regulatora transkrypcji genów. (Rycina. 1,2,3)
Zwraca uwagę na podstawie dostępnego piśmiennictwa, iż zapotrzebowania na biotynę przy

prawidłowym jej metabolizmie jest niewielkie. Zwiększa się natomiast w stanach katabolizmu, w trakcie ciąży, laktacji, terapii np. lekami przeciwpadaczkowymi czy kwasem liponowym. W kolejnym podrozdziale Doktorantka prezentuje molekularne podłoże deficytu biotynidazy. Wyjaśnia budowę i funkcje genu *BTD*. Najczęściej wykrywane patogenne warianty genu *BTD* (*wg BTD database*). Autorka zamieściła w tabeli 1. Kolejnym omawianym zagadnieniem jest charakterystyka fenotypu klinicznego deficytu biotynidazy. Aktywność enzymu warunkuje bardzo zróżnicowany obraz kliniczny. Nakreśla charakterystyczne objawy kliniczne częściowego i głębokiego deficytu biotynidazy. Na podstawie piśmiennictwa wyjaśnia, iż pacjenci z częściowym deficytem biotynidazy i nosiciele patogenicznego wariantu genu *BTD* mogą być bezobjawowi, natomiast w stanach zaburzeń homeostazy organizmu, mogą rozwinąć objawy typowe dla głębokiego deficytu tego enzymu. Zwraca szczególną uwagę na objawy uszkodzenia OUN jak: lekooporna padaczka, czy symptomy imitujące choroby demielinizacyjne, zapalne lub neurodegeneracyjne, które w wyniku zastosowanej terapii biotyną mogą ulec częściowej a nawet całkowitej regresji, podobnie jak zmiany obserwowane w neuroobrazowaniu (MR, MRS). Diagnostykę w deficycie biotynidazy a także leczenie Doktorantka prezentuje w kolejnych podrozdziałach. Omawia badania jakościowe aktywności enzymu biotynidazy w „suchej” kropli krwi, ilościowe aktywności enzymu w surowicy krwi, badania pomocnicze oraz potwierdzające chorobę, do których należy analiza molekularna genu *BTD* u pacjentów z obniżoną aktywnością biotynidazy w badaniach jakościowych czy ilościowych. Na podstawie piśmiennictwa Doktorantka przedstawia dane dotyczące częstości występowania deficytu biotynidazy oraz nosicielstwa w populacji na świecie i w Europie. Leczenie w deficycie biotynidazy polega na stałym stosowaniu doustnie wolnej biotyny: Jak podaje autorka dotychczas nie uzgodniono jednolitego zalecenia dawkowania u pacjentów z deficytem biotynidazy. W wyniku zastosowanej terapii dochodzi do regresji a nawet ustąpienia niektórych objawów klinicznych. Rokowanie w deficycie biotynidazy zależne jest od czasu ustalenia rozpoznania i rozpoczęcia leczenia. Pacjenci, u których rozpoznano deficyt biotynidazy w badaniach przesiewowych noworodków i zastosowano leczenie biotyną w większości pozostają bezobjawowi.

Zgodnie z przyjętymi założeniami i zaplanowanym celem głównym Doktorantka wyznaczyła cele szczegółowe:

1. Charakterystykę kliniczną, wyniki diagnostyki potwierdzającej i wyniki obserwacji pacjentów zidentyfikowanych poprzez pilotażowe w populacji polskiej badania przesiewowe noworodków w kierunku deficytu biotynidazy.
2. Próbę ustalenia korelacji genotyp-fenotyp u polskich pacjentów z deficytem biotynidazy.
3. Oszacowanie częstości występowania deficytu biotynidazy w populacji polskiej.

4. Opracowanie zaleceń postępowania w przypadku uzyskania nieprawidłowego wyniku badania przesiewowego noworodków w kierunku deficytu biotynidazy.

Badaniem objęto grupę 22 dzieci, u których wykryto nieprawidłowe wyniki w kierunku deficytu biotynidazy w pilotażowym badaniu przesiewowym noworodków realizowanym w Zakładzie Badań Przesiewowych i Diagnostyki Metabolicznej IMiD od marca 2016r. do sierpnia 2020r.. W tym okresie przebadano 1071463 noworodków w kierunku deficytu biotynidazy. Ponownego oznaczenia aktywności enzymu w „suchej” kropli krwi wymagało 1538 noworodków. W badanej grupie 18 pacjentów zostało objętych opieką w Poradni Chorób Metabolicznych oraz Kliniki Wrodzonych Wad Metabolizmu i Pediatrii IMiD, natomiast 4 dzieci znajduje się pod opieką Poradni Chorób Metabolicznych Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego w Krakowie. Czas obserwacji dzieci będących pod opieką IMiD wynosił od 1-53 miesięcy. U dzieci z nieprawidłowym wynikiem badania przesiewowego noworodków w kierunku deficytu biotynidazy (badania z „suchej” kropli krwi) przeprowadzono badania weryfikujące, tj:

- obserwację kliniczną,
- powtórne badanie aktywności enzymu biotynidazy w „suchej” kropli krwi,
- badanie aktywności enzymu biotynidazy w surowicy krwi metodą kolorymetryczną,
- profil kwasów organicznych w moczu metodą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią masową (GCMS),
- profil acylokarnityn w „suchej” kropli krwi metodą tandemowej spektrometrii mas (MS/MS),
- badania molekularne.

Badania zostały przeprowadzone w ramach rozszerzonego programu badań przesiewowych noworodków w całości finansowanego przez Ministerstwo Zdrowia. Badania biochemiczne wykonano w Zakładzie Badań Przesiewowych i Diagnostyki Metabolicznej IMiD. Badania molekularne przeprowadzono w Centrum Medycznym Medgen. Obserwacja kliniczna i zlecenie przeprowadzenia badań dodatkowych pozostawały w gestii lekarza Poradni Chorób Metabolicznych, Kliniki Wrodzonych Wad Metabolizmu i Pediatrii IMiD.

Część dotycząca metodologii nie budzi wątpliwości, została odpowiednio zaplanowana, napisana poprawnie w sposób zrozumiały.

Rozdział pt: „Wyniki” liczy 27 stron. Podzielony został na 5 podrozdziałów. W pierwszym Doktorantka przedstawia kliniczną charakterystykę grupy badanej. Przytacza dane demograficzne, szczegóły

dotyczące wywiadu rodzinnego i okresu prenatalnego. Istotne informacje dotyczące okresu okołoporodowego zamieściła w tabeli 2.

W kolejnym podrozdziale odnoszącym się do analizy wyników badań biochemicznych, Autorka przedstawiła wyniki aktywności biotynidazy w „suchej” kropli krwi, w surowicy krwi oraz wstępne rozpoznanie w badanej grupie (Tabela 3). Aktywność biotynidazy w „suchej” kropli krwi oznaczono u dziecka 1-4 krotnie. Średnia wartość aktywności biotynidazy we wszystkich badanych „suchych” kroplach krwi wynosiła w badanej grupie 27,8% z wartością mediany równą 23%. Aktywność biotynidazy w surowicy, weryfikująca nieprawidłowy wynik aktywności enzymu w „suchej” kropli krwi wynosiła od 0% do 102% z wartością mediany równą 22% i średnią wartością aktywności enzymatycznej równą 27,9%. Na podstawie wywiadu, obrazu klinicznego i wyników badań biochemicznych wstępnie zidentyfikowano sześć przypadków głębokiego deficytu biotynidazy, dziesięć przypadków częściowego deficytu biotynidazy, oraz sześcioro dzieci zdrowych (w tym dwa przypadki prawdopodobnego stanu nosicielstwa deficytu biotynidazy). Badania wykonano najczęściej między 25 a 31 dobą życia. W ramach diagnostyki różnicowej deficytu biotynidazy u 18 dzieci wykonano analizę profilu kwasów organicznych w moczu metodą GCMS. (między 8 dobą życia a 8 miesiącem życia). Podwyższony poziom w moczu kwasu 3-hydroksyzowalerianowego, będącego markerem deficytu biotynidazy stwierdzono jedynie u dwóch pacjentów. (Tabela 4). Analizę wyników badań molekularnych w badanej grupie Doktorantka przedstawiła w kolejnym podrozdziale. Badania molekularne przeprowadzono u 17 pacjentów. W przypadku czworga dzieci, u których aktywności biotynidazy mieściła się w zakresie wartości prawidłowych odstąpiono od wykonania badań molekularnych. Zakres badanych obszarów genu *BTBD* w badanej grupie zawarta jest w tabeli 5. Najczęściej badanymi sekwencjami kodującymi w genie *BTBD* był ekson 2 i 3 oraz fragmenty eksonu 4. Ogółem w badanej grupie pacjentów w 34 allelach zidentyfikowano 37 wariantów patogennych lub prawdopodobnie patogennych, w tym 16 różnych wariantów. (Tabela 6.) Najczęściej wykrywany był wariant c.[1330G>C] (p. Asp 444His), który stanowił 38% zidentyfikowanych zmian. Drugi co do częstości był wariant c.[643C>T] (p.Leu.215Phe) stanowił 19% wykrytych wariantów. Pozostałe warianty zidentyfikowano na pojedynczych allelach. W badanej grupie wykryto trzy nowe potencjalnie patogene warianty. Kolejnym etapem diagnostyki molekularnej było określenie częstości występowania wariantów patogennych p. Asp444His oraz p.Leu215Phe w badanej grupie kontrolnej. Analiza molekularna przeprowadzona w grupie kontrolnej liczącej 1097 osób (bez podejrzenia lub rozpoznania deficytu biotynidazy) pozwoliła oszacować częstość występowania patogennych wariantów p. Asp444His i p. Leu215Phe. Częstość występowania tych wariantów wśród przebadanych alleli wynosiła odpowiednio 5,2% oraz 0,045%. Charakterystykę wykrytych patogennych wariantów i weryfikację rozpoznania w badanej grupie Autorka zamieściła w tabeli 6.

Kluczowa dla ustalenia ostatecznego rozpoznania deficytu biotynidazy była wartość aktywności biotynidazy w surowicy krwi skorelowana z wynikiem badania molekularnego. Ostatecznie w badanej grupie dzieci, u których w badaniu przesiewowym noworodków wysunięto podejrzenie deficytu biotynidazy zidentyfikowano sześć przypadków głębokiego deficytu biotynidazy, dziesięć przypadków częściowego deficytu biotynidazy oraz sześć przypadków dzieci zdrowych w tym dwa przypadki prawdopodobnego stanu nosicielstwa. (Tabela. 6.). Dalszą część rozprawy stanowiła szczegółowa charakterystyka kliniczna wraz z wynikami diagnostyki potwierdzającej i wynikami obserwacji pacjentów z głębokim i częściowym deficytem biotynidazy a także dzieci, u których wykluczono deficyt enzymu – dzieci zdrowych. Zgodnie z rekomendacjami pacjenci otrzymali leczenie biotyną średnio w 5 tygodniu życia. Podczas suplementacji biotyną i po jej odstawieniu nie obserwowano objawów niepożądanych.

Otrzymane wyniki pozwoliły Doktorantce na oszacowanie częstości występowania deficytu biotynidazy w Polsce na 1: 66966 urodzeń, w tym postaci głębokiego deficytu biotynidazy na 1:178577 urodzeń i postaci częściowego deficytu biotynidazy na 1: 107146 urodzeń.

Kolejnym rozdziałem rozprawy jest Dyskusja licząca 19 stron , w której Doktorantka szeroko omówiła i przedyskutowała zagadnienie będące przedmiotem rozprawy. W tabeli 7 przedstawiła charakterystykę wykrytych patogennych wariantów z korelacją genotyp-fenotyp. Natomiast wykaz zidentyfikowanych genotypów wraz z aktywnością biotynidazy w badanej grupie w korelacji z danymi z piśmiennictwa zamieściła w tabeli 8 i rycinie 4. Dyskusja prowadzona jest bardzo dobrze, w uporządkowany sposób, potwierdzając wiedzę Doktorantki jak również znajomość cytowanego piśmiennictwa, głównie zagranicznego. Doktorantka porównała wyniki prowadzonych badań z badaniami innych autorów co jest dowodem dużych umiejętności prowadzenia polemiki naukowej.

Wyniki badań przeprowadzonych przez Doktorantkę potwierdziły konieczność wdrożenia kompleksowej diagnostyki , w tym badań molekularnych szczególnie w grupie dzieci, u których różnicowanie częściowego deficytu biotynidazy ze stanem nosicielstwa może być trudne. Zdaniem autorki w celu poprawy precyzji wyników badania przesiewowego w kierunku deficytu biotynidazy pomocna byłaby analiza genu *BTD* wykorzystująca bibułę przesiewową jako „second tier test”.

Uzyskane wyniki i dane w piśmiennictwie pozwoliły Doktorantce sformułować wnioski odpowiadające na cele pracy:

1. U noworodków z małą masą ciała – tj. urodzonych z hipotrofią wewnątrzmaciczną i/lub przedwcześnie – pojedynczy wynik badania przesiewowego w kierunku deficytu biotynidazy nie może być podstawą do podejrzenia tej choroby, a powinien zostać powtórzony z oznaczeniem aktywności biotynidazy w surowicy, którego wartość jest rozstrzygająca

2. Wobec zmiennych odchyleń biochemicznych, obserwowanych w deficycie biotynidazy (zwłaszcza aktywność enzymu w „suchej” kropli krwi czy profilu kwasów organicznych w moczu) szczególnie u dzieci bezobjawowych klinicznie i z granicznymi wartościami oznaczeń enzymatycznych, wskazane jest określenie genotypu celem ustalenia ostatecznego rozpoznania.
3. Dotychczasowe doniesienia dotyczące korelacji genotyp-fenotyp w deficycie biotynidazy bywają niespójne. Pewna korelacja jest możliwa w niewielu przypadkach, np. najczęstszy wariant p.Asp444His obecny w jednym z alleli odpowiada za wystąpienie częściowego deficytu biotynidazy, a obecny w układzie homozygotycznym powoduje obniżenie aktywności enzymu do połowy. Jednocześnie wariant p.Asp444His w konfiguracji *in cis* z nowo wykrytymi wariantami jest odpowiedzialny za wystąpienie głębokiego deficytu biotynidazy.
4. Pilotażowe badania przesiewowe noworodków w kierunku deficytu biotynidazy w Polsce potwierdziły znaczenie kliniczne przedobjawowej identyfikacji pacjentów i wykazały większą częstość występowania w populacji polskiej częściowego względem głębokiego deficytu biotynidazy, co jest zgodne z piśmiennictwem europejskim i amerykańskim.
5. Oszacowana częstość występowania deficytu biotynidazy w populacji polskiej zarówno dla głębokiego i częściowego deficytu wynosi 1:66966 urodzeń, w tym dla częściowego deficytu biotynidazy – 1: 107146 urodzeń, a dla głębokiego deficytu biotynidazy – 1: 178577 urodzeń.
6. Wobec możliwości wystąpienia objawów i podstępного przebiegu choroby u pacjentów z częściowym deficytem biotynidazy a więc konieczności monitorowania ich stanu klinicznego z zaleceniami prewencyjnej suplementacji biotyną, są podstawy do rozszerzenia wskazań w badaniach przesiewowych noworodków o postać częściowego deficytu biotynidazy.
7. W związku z trudnościami w diagnostyce weryfikującej i różnicowej, nieprawidłowych wyników badań przesiewowych noworodków w kierunku deficytu biotynidazy, ważne znaczenie praktyczne ma opracowanie zaleceń dla lekarzy specjalistów pediatrii metabolicznej i pediatrów opiekujących się dziećmi wykrytymi poprzez te badania.

Na podstawie własnych wyników i danych piśmiennictwa Autorka opracowała zalecenia postępowania:

- w przypadku nieprawidłowego wyniku badania przesiewowego noworodków w kierunku deficytu biotynidazy
- zalecenia postępowania w przypadku uzyskania nieprawidłowego wyniku badania przesiewowego noworodków świadczące o rozpoznaniu głębokiego deficytu biotynidazy (tj. aktywność biotynidazy: <10%)

- zalecenia postępowania w przypadku uzyskania nieprawidłowego wyniku badania przesiewowego noworodków świadczące o rozpoznaniu częściowego deficytu biotynidazy (tj. aktywności biotynidazy: 10%-30%)

- zalecenia postępowania w przypadku obciążonego wywiadu rodzinnego w kierunku głębokiego deficytu biotynidazy.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa jest poprawnie zaplanowana i napisana. Moje uwagi dotyczą:

1. Pacjent nr. 22 z grupy kontrolnej, u którego poza oznaczeniem aktywności biotynidazy w SKK brak jest informacji dotyczącej charakterystyki klinicznej i obserwacji. Nie oznaczono aktywności enzymu w surowicy krwi jak również nie wykonano badania molekularnego.
2. Tabela 2. (Pacjent nr. 21) urodzeniowa masa ciała wynosi 1730g, natomiast w szczegółowym opisie przypadków podano wartość 1710g.
3. Strona 15. w 12 Doktorantka cytuje: w spektroskopii MR u pacjentów objawowych wykryto wzrost kwasu mlekowego oraz zmniejszony stosunek kwasu N-acetyloasparaginowego do kreatyny. Wg autora: w spektroskopii MR wykryto wzrost mleczanu, odwrócenie stosunku choline do kreatyny (Cho/Cr) i spadek pików NAA. (S. Desai. poz. pism. 26)

Uwagi nie umniejszają wartości rozprawy i nie mają wpływu na moją pozytywną ocenę.

Podsumowując stwierdzam, iż przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska lek. med. Lidii Suchoń pt: „Ocena znaczenia klinicznego, wykrywanego w badaniach przesiewowych noworodków w populacji polskiej, deficytu biotynidazy wraz z próbą określenia korelacji genotyp-fenotyp wnosi nowe wartości poznawcze ale również posiada walor praktyczny. Doktorantka osiągnęła nakreślone w pracy cele i z postawionego sobie zadania wywiązała się bardzo dobrze. W wykonanej pracy Autorka dowiodła, iż posiada duży zasób wiedzy oraz umiejętności prowadzenia polemiki naukowej. Na szczególną ocenę zasługują opracowane przez Doktorantkę dla lekarzy zalecenia postępowania w przypadku uzyskania nieprawidłowych wyników badania przesiewowego noworodków w kierunku deficytu biotynidazy.

Uważam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz. U z 2021r., poz. 478 ze zm.).

W związku z powyższym zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Matki i Dziecka w Warszawie o dopuszczenie lek. med. Lidii Suchoń do dalszych etapów przewodu doktorskiego.