Prof. dr hab.med. Lech Korniszewski
Zakład Genetyki
Instytut Fizjologii i Patologii Słuchu
Kajetany, ul.Mokra 17

RECENZJA

ROZPRAWY DOKTORSKIEJ MGR KATARZYNY NIEPOKÓJ

P.T. „ANALIZA GENETYCZNA I MOLEKULARNA IZOLOWANYCH POSTACI NIEDOSŁUCHU. PRÓBA IDENTYFIKACJI GENÓW I MUTACJI ODPOWIEDZIALNYCH ZA POSTAĆ DZIEDZICZNĄ CHOROBY"

Zgodnie z powierzoną mi recenzją pracy przedstawionej przez mgr Katarzynę Niepokój jako rozprawa doktorska mam zaszczyt podać następujące opinie i wnioski. Przedstawiona praca dotyczy ważnego problemu diagnostyki molekularnej izolowanych postaci niedosłuchu a także ogólnego problemu coraz ważniejszej roli genetyki molekularnej w ustalaniu diagnozy klinicznej. Dzisiaj nierzadko zdarza się, że rozpoznanie ustala genetyk molekularny a nie tylko potwierdza badaniem diagnozę kliniczną. Praca mgr Katarzyny Niepokój jest tego dowodem.

Praca powstała w Zakładzie Genetyki Instytutu Matki i Dziecka, w Pracowni Badań Chorób Dziedzicznych. Promotorem rozprawy jest profesor Jerzy Bal, wieloletni kierownik Zakładu, inicjator pierwszych badań molekularnych niedosluchu w Polsce. To w tym Zakładzie powstała już przed 20 laty praca doktorska dr Wojciecha Wiszniewskiego „Izolowana postać głuchoty wrodzonej badania molekularne genu GJB2" Praca mgr Katarzyny Niepokój jest kontynuacją szczytnych tradycji Zakładu w badaniach molekularnych nad przyczynami niedosłuchu.

Praca obejmuje 119 stron, w tym bibliografię zawierającą – wraz z źródłami internetowymi – 153 pozycje piśmiennictwa z najnowszymi pracami dotyczącymi tematu rozprawy. W tekście pracy znajdują się liczne tabele, rodowody i ryciny a także wzór „Formularza" zaproponowanego przez doktorantkę do oceny klinicznej pacjenta z niedosłuchem.

We wstępie omówiona została budowa ucha wewnętrznego, zobrazowana trzema dobrze dobranymi rycinami oraz proces słyszenia. W dalszej części wstępu autorka omówiła definicje i epidemiologię niedosłuchu a także – w formie tabeli (tab.1) – przedstawiona została klasyfikacja niedosłuchu. Niedosłuch podzielono na przewodzeniowy i odbiorczy, prelingwalny i postlingwalny, izolowany i syndromiczny. Przy omawianiu lokalizacji defektu w niedosłuchu odbiorczym autorka użyła zbyt ogólnych okresleń („centralny – gdy dotyczy mózgu", „obwodowy – gdy dotyczy nerwów") Nie jest to błąd, ale zwraca uwagę ogólnikowość określeń. Mam jeszcze jedną uwagę dotyczącą podziału w zależności od stopnia niedosłuchu w tab.1 Przedstawiła go autorka jako „Głębokości uszkodzenia słuchu", opierając się na stopniu utraty (dB) i określając jako lekki, średni, znaczny i głęboki. Tymczasem w „Formularzu" (załącznik 4) podano podział na łagodny, umiarkowany, ciężki i głęboki. Według mnie nie powinno być różnic w nomenklaturze i należałoby używać tych samych określeń, a lepsze wydają się stopnie niedosłuchu w „Formularzu" niż „Głębokości uszkodzenia". Mgr Katarzyna Niepokój jest genetykiem molekularnym i klasyfikacja kliniczna jest dla niej – co zrozumiałe – obca. Z tych względów rozgrzeszam doktorantkę ale równocześnie proponuję aby uzgodniła terminologię z audiologiem. Chcę tu podkreślić, że moje uwagi nie umniejszają wartości pracy. Temat tej pracy doktorskiej jest ciekawy i bardzo ważny – nie tylko dla genetyków i audiologów ale i dla lekarzy wielu innych specjalności a praca, która wykonała mgr Katarzyna Niepokój zasługuje na najwyższe uznanie. Postępy genetyki molekularnej są wystarczającym powodem aby klinicysta zapoznał się z możliwościami, zastosowaniami i ograniczeniami nowych metod badań molekularnych w klinice. Można też mieć nadzieję, że wkrótce lekarz będzie włączał się w nowoczesny proces diagnostyczny, co będzie wymagało pewnej znajomości nowych metod badań. I odwrotnie: praca mgr Katarzyny Niepokój jest dowodem, że genetyk molekularny zaczyna uczyć się kliniki (oczywiście w ograniczonym zakresie).

Podrozdział 4.1 poświęcony jest omówieniu niedosłuchu izolowanego, zwłaszcza obejmującego locus DFNB1. Ta część jest bardzo dobrze napisana, świadczy o dużej wiedzy i umiejętności jej przekazania. Podrozdział 4.2 to omówienie niedosłuchu syndromicznego. Doktorantka podaje, że znanych jest ponad 700 zespołów wad, w których jednym z objawów jest niedosłuch. Określenie „zespół wad" jest używane zwykle dla zespołów wad budowy. Niedosłuch oczywiście występuje w wielu zespołach z wadami budowy, ale są zespoły z niedosłuchem w których nie ma wad budowy. Trudno bowiem zmiany w błonie podstawnej kłębków w zespole Alporta uznać za wadę, podobnie jak zmiany zwyrodnieniowe siatkówki w zespole Ushera. Dlatego proponowałbym opuszczenia słowa „wad" i używanie określenia „zespoły z niedosłuchem". W tym podrozdziale omówiono dość dokładnie ale w sposób prosty i kompetentny trzy najczęstsze zespoły z niedosłuchem: zespół Ushera, Pendreda

i Waardenburga. Autorka przedstawiła też w uproszczonej ale ciekawej graficznie formie zaburzenia funkcji narządów, wchodzące jako najważniejszy poza niedosłuchem element zespołu (ryc.5). Na stronie 20 przy opisie zespołu Ushera użyte jest określenie „Jednoczesne zaburzenie procesu słyszenia i widzenia". Proponuję, aby słowo jednoczesne zastąpić slowem „współistnienie". Słowo „jednoczesne" może sugerować jednoczesne wystąpienie niedosłuchu i niedowidzenia, a tak najczęściej nie jest. Inne dość częste zespoły z niedosłuchem – choć nie tak częste jak trzy wymienione wyżej – omowione są krótko ale bardzo dobrze w formie tabeli (tab.5).

Rozdział 5 poświęcony jest zastosowaniu nowych metod analizy DNA a w szczególności sekwencjonowaniu następnej generacji (NGS) do badań molekularnych w niedosłuchu. Użyte przez autorkę określenie, że metoda NGS to rewolucja w poszukiwaniach molekularnego podłoża niedosłuchu nie jest przesadzone. Czytając tą część doktoratu czuje się, że mgr Katarzyna Niepokój jest „wciągnięta" w NGS i z pewnością bardzo kompetentna.

Część II to przedstawienie celów pracy. Autorka podzieliła je na badawcze i praktyczne. Cele badawcze to ustalenie podłoża molekularnego oraz identyfikacja genów – to cele odpowiadające założeniu pracy. Jeszcze jednym celem badawczym który zaplanowano jest ocena patogenności wariantów dotychczas nieopisanych – jako mutacji przyczynowych w niedosluchu. Jako cele praktyczne przedstawiono: molekularną weryfikację rozpoznań klinicznych oraz zaprojektowanie i opracowanie panelu do badań metodą NGS. Wreszcie jako trzeci cel praktyczny zaplanowano opracowanie nowego schematu diagnostycznego dla polskich pacjentów z niedosłuchem izolowanym.

Część III to szczegółowe omówienie materiału badawczego i metod. Cała ta część napisana jest przejrzyście i jasno a opis materiałów (odczynniki i aparatura) bardzo szczegółowy. Bardzo przystępnie opisane są metody badawcze: MLPA, sekwencjonowanie metodą Sangera, NGS – z bardzo przejrzystym schematem procedury. Również w formie przejrzystej ryciny przedstawiono bioinformatyczną analizę danych NGS.

Wyniki badań przedstawiła autorka w częsci IV. Badania molekularne wykonano u 48 pacjentów z niedosłuchem izolowanym u których wykluczono mutacje genu GJB2 i delecje genu GJB6 oraz zakażenia wrodzone, które mogą wywoływać niedosłuch. Do badań doktorantka używała dwóch paneli: TruSight One (16 pacjentów) i panelu opracowanego w Zakładzie Genetyki Instytutu Matki i Dziecka (który doktorantka nazwała familiarnie „panelem zakładowym") – 32 pacjentow. Analizę molekularną pacjentów przedstawiono w formie diagramów z trzema kategoriami: ustalenie rozpoznania molekularnego, nie ustalenie, wynik niejednoznaczny. Wyniki w obu grupach róznią się nieznacznie (np. nie ustalenie diagnozy 31% versus 47%). Różnice te zależą najpewniej od stosunkowo małej liczebności grup. Mnie osobiście trochę przeszkadzało to, że autorka nie podała ani razu ilości pacjentów z określonym

rozpoznaniem w formie liczbowej (np. 5 pacjentów). Jeśli chciałem dowiedzieć się ilu pacjentów miało delecję lub inną mutację genu stereocyliny to musiałem przegladać tabelę 11 i „szukać po genach" (w tym wypadku policzyć ile w odpowiedniej rubryce jest mutacji STRC). Oczywiście można też było wnioskować o liczbie pacjentów na podstawie wysokości diagramów (ryc.11) przedstawiających liczbę zmutowanych alleli genu STRC. To nie jest oczywiście żaden defekt, to raczej ja zrobiłem się na starość zbyt wygodny. Zresztą zaczęło mi się nawt podobać takie alleliczne spojrzenie na pacjentów a może i na świat. Autorka w podrozdziale 3ocenia patogenność nowo zidentyfikowanych wariantów. Warianty te w liczbie 7 przedstawiono z szczegółowym opisem zmiany w DNA i zmiany białka, w odniesieniu do programów predykcyjnych i baz danych. To bardzo ważna część pracy doktorskiej, rozszerzająca nasze horyzonty molekularne.

Podrozdział 4 to przedstawienie badań nad segregacją wykrytych mutacji w rodzinach w formie standartowych rodowodów. Prawie wszystkie rodowody dobrze obrazują segregację recesywną (13) oraz dominującą (2). Duża wielostronicowa tabela 13 „Korelacja genotyp-fenotyp" jest pomyślana jako zestawienie wyników badań molekularnych z danymi klinicznymi.
W poszczególnych rubrykach umieszczone są informacje z literatury dotyczące genu i znanych mutacji ale także są dane kliniczne badanych pacjentów. Doktorantka, która jest genetykiem molekularnym musiała się zmierzyć z problemami klinicznymi stąd słuszne jej uwagi i komentarze dotyczące tej kwestii („wymaga ewaluacji klinicznej", „niezbędna jest obserwacja i ponowna ocena kliniczna", „wymaga badań kardiologicznych"). W dwóch przypadkach zespołu Ushera autorka pracy sugeruje: „wymaga specjalistycznych badań okulistycznych" (nawiasem mówiąc, takie „specjalistyczne" badanie dna oka może wykonać każdy okulista, ale jeśli ktoś nie jest klinicystą – tak jak mgr Katarzyna Niepokój – może o tym nie wiedzieć). Mimo moich uwag rozgrzeszam całkowicie doktorantkę z tej części klinicznej „Korelacja genotyp-fenotyp". Dla mnie ważniejszy jest fakt, że doktorantka zdaje sobie sprawę, że dane kliniczne wiążą się ściśle z wynikami jej badań molekularnych.

W podrozdziale 6 i 7 doktorantka przedstawiła wyniki swoich badań częstości występowania zidentyfikowanych mutacji w grupie pacjentów z niedosłuchem i w grupie kontrolnej. Rycina 28 obrazuje w formie diagramów zestawienie wyników w obydwu grupach. Wreszcie w podrozdziale 8 przedstawione zostają analizy wyników badań pacjentów z niejednoznacznym wynikiem badań molekularnych. Ocena patogenności 11wariantów genów, których znane mutacje są patogenne jako przyczyna niedosłuchu omówiono w formie tabeli numer 18.

Obszerny rozdział V to Dyskusja. We wstępie do dyskusji doktorantka nawiązuje do niedosłuchu jako schorzenia wyjątkowo niejednorodnego etiologicznie, także pod względem molekularnym. Następnie omawia grupę którą badała, porównując z innymi grupami badanymi metodą NGS. Kolejno

omówione są: opracowanie potoku analizy danych NGS, porównanie paneli zastosowanych do badań i wreszcie analizę molekularną : wykrywalność mutacji genów, które odpowiadają za niedosłuch. Mutacje zidentyfikowane jako przyczynowe (łącznie 33), z tego 74% to mutacje recesywne. Siedem mutacji wykrytych przez doktorantkę nie jest opisanych w bazach HGMD Professional i bazie ClinVar. Jeden z podrozdziałów poświęcony jest delecjom genu STRC, ale gen ten „zasłużył" na osobny rozdział. To szczególnie ważna część pracy doktorskiej mgr Katarzyny Niepokój. Mutacje tego genu – głównie w formie delecji – to najczęstsza przyczyna niedosłuchu w badanej grupie, określona na 5 osób. Używam tego określenia, ponieważ w istocie liczba ta jest większa: badając rodziny chorych wykryto jeszcze trzy osoby z mutacjami genu STRC. Jedna to siostra probanta (rodowód TSO_7) i dwie to bracia probantki (rodowód P_28). Razem jest to 8 pacjentów z mutacjami STRC w grupie 48 badanych. Tych troje nie zostało uwzględnionych mimo, że mieli objawy kliniczne (niedosluch) i mutacje genu STRC. W pracy nie doszukałem się wyjaśnienia dlaczego nie włączono ich do grupy z niedosłuchem. Uwzględniając łączną liczbę 8 osób z mutacjami STRC stanowią oni ponad połowę wszystkich zespołów recesywnych. Tak wysoka częstość znajduje odbicie w proponowanym przez doktorantkę algorytmie diagnostycznym.

Podrozdział 4 Dyskusji to problem zmiany rozpoznania klinicznego. Dotyczył on 36.8% badanych – nieco więcej w porównaniu z cytowanym piśmiennictwem, ale wiek pacjentów wpływał na występowanie pewnych objawów. Kolejne podrozdziały poświęcono problemowi wykrycia dodatkowych mutacji – poza przyczynowymi. Nie ma zgodności poglądów, czy należy te „znaleziska" raportować a dorosłych pacjentów informować o wykryciu. Niejednoznaczne wyniki analizy molekularnej omówiła autorka pracy wyczerpująco, zwracając uwagę że w przypadku wykrycia tylko jednej kopii genu recesywnego z mutacją nie możemy wykluczyć, że druga kopia z mutacją znajduje się w regionie genu nie objętych badaniem. Nie ustalono molekularnego podłoża niedosłuchu u 20 badanych (prawie 42%).

Bardzo ważną częścią pracy mgr Katarzyny Niepokój jest zaproponowany przez nią Algorytm Diagnostyczny. Jest on logiczny i prosty – wydaje się, że swoją prostotą nie wnosi nic odkrywczego. Ale tak nie jest – wystarczy porównać podobne badania aby przekonać się, że dość powszechna jest pewna „dowolność diagnostyczna" : w części prac przed analizą NGS nie wykluczano mutacji w locus DFNB1, w części wykluczano tylko u niektórych pacjentów. Stąd być może biorą się różnice w częstości wykrywania mutacji i trudności w porównywaniu wyników. Na marginesie: zwróciłem uwagę, że autorka parokrotnie podkreśla, że algorytm jest przeznaczony dla polskich pacjentów. Być może wynika to z wyjątkowo dużej częstości mutacji stereocyliny. Nie przedstawiono jednak danych wskazujących na różnice między częstością tych mutacji w Polsce i innych krajach europejskich. A może takich różnic nie ma i zaproponowany przez mgr Katarzynę Niepokój algorytm mógłby być zalecony

przez EMQN ?

Temat pracy doktorskiej mgr Katarzyny Niepokój jest ważny dla lekarzy wielu specjalności. To przede wszystkim audiolodzy, laryngolodzy, pediatrzy, androlodzy, ginekolodzy, okuliści. Zainteresowanie problemem skojarzenia, nieprzypadkowego współistnienia różnych objawów z niedosłuchem powinno skłonić lekarzy różnych specjalności do kierowania na badania molekularne w kierunku zespołów z niedosłuchem. Tak więc schorzenia towarzyszące – ważny punkt proponowanego przez doktorantkę „Formularza" – choć nie mają nic wspólnego z aktualną terminologią czasów pandemii – powinny kierować diagnostykę w właściwym kierunku. Do tego potrzebna jest jednak świadomość problemu. Z tego względu uważam, że doktorantka powinna napisać pracę poglądową na temat genetycznych związków niedosłuchu z dodatkowymi objawami, które mogą skłaniać do badań w celu ustalenia diagnozy zespołu. Licząc, że taka praca się ukaże, przekazuje kilka uwag które mogą być uwzględnione w ew. publikacji. Uwagi te i drobne błędy na moją wysoką ocenę recenzowanej pracy doktorskiej. (nie wpływają)

str.11 – „Ucho wewnętrzne rozwija się pomiędzy 4 a 5 mies.życia (rozumiem, że płodowego); Ucho wewnętrzne zaczyna się rozwijać od 7 tygodnia życia zarodkowego, w tym czasie komórki przewodu ślimaka różnicują się tworząc narząd spiralny Cortiego, który posiada już receptory komórek rzęsatych. (W.Larsen, „Human embryology", rozdz.12 „Development of inner ear"str.354

str.17 – Pomyłka co do cytowanej pracy Kelselai wsp.(57). Powinna to być podana inna praca Kelsela i wsp. ale opublikowana nie w roku 2000 ale w roku 1998 w „Nature"

str.28 – W tabeli 6 „Kryterium włączenia do badań" proponuję zamiast „brak wad towarzyszących" – „bez wad towarzyszacych"; zamiast „brak infekcji wrodzonych" – „ bez infekcji wrodzonych". Slowo „brak" odnosi się do czegoś co powinno być.

str. 42 – czwarta linijka od góry: warianty typu LoF (ang. Lost of Function) powinno być Loss of Function = rzeczownik a nie czasownik

str. 46 – W tab.11 „Wyniki genotypowania pacjentów": przy pacjencie P_12 wpisanow rubryce nosicielstwo innych mutacji: zmiana rozpoznania na zespół Perraulta. Powinno to być wpisane przy pacjenci P_8 !

str.49 – przy tabeli 12 objaśnienie skrótów to załącznik 2 a nie 4 (załącznik 4 to „Formularz ewaluacji klinicznej")

str. 69 i 70 – w opisie mutacji PTPRQ błędnie podano numer piśmiennictwa (praca Oziebło i wsp.) ; nie 89 a 92

str.75 – omylka w numerz ryciny: nie ryc.26 a 28 (rycina 26 to rodowod P_27 na str.60

str. 77 : mutacja pTrp2294Ter dziedziczy się autosomalnie dominująco a nie recesywnie

str.80 – zespół Easta – nazwa ta jest nieodmienialna i powinna być pisana

dużymi literami : zespół EAST. Jest to bowiem akronim głównych objawów choroby: Epilepsy, Ataxia, Sensorineural deafness, Tubulopathy

Pewnych poprawek wymaga także „Formularz ewaluacji klinicznej" (załącznik 4, str. 118 i 119). Zaproponowano w nim podanie adresu e-mail pacjenta ale nie wymaga się adresu pocztowego z kodem (nie wszyscy mają adres e-mail ale wszyscy mają adres pocztowy). Podane w „Formularzu pytania dotyczące niedosłuchu w rodzinie dotyczą rodziców i dalszej rodziny. A rodzeństwo pacjenta? To nie dalsza ale bliska rodzina. Proponuję też aby w „Formularzu" zamieścić rubrykę „Audiogram" : nieprawidlowy zapis niskich częstotliwosci sugeruje mutacje WFS1 a „łagodne zejście" średnich częstotliwosci może sugerować mutację STRC. Radzę też zastanowić się nad zastąpieniem slowa „ewaluacja" słowem ocena. To polskie slowo i odpowiada w pełni ewaluacji.

Ocena poziomu i przydatności pracy – moje wnioski wypływające z recenzji

- Temat badań podjętych przez doktorantkę to pierwsza w Polsce próba poznania podłoża niedosłuchu izolowanego z zastosowaniem najnowszych metod badań molekularnych

- Doktorantka wykazała umiejętność formułowania problemów badawczych i wyboru metod służących do ich rozwiązania

- Nowoczesna metodyka badań umożliwiła doktorantce ocenić podłoże molekularne niedosłuchu w populacji polskiej

- Wnioski wypływające z wykonanych badań pozwoliły doktorantce zaproponować nowy algorytm diagnostyczny, upraszczający dotychczasowe postępowanie diagnostyczne

- Prace mgr Katarzyny Niepokój przeczytałem z satysfakcją a z jej wnioskami zgadzam się całkowicie

Recenzowana rozprawa doktorska odpowiada w pełni warunkom określonym w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (DZ.U. 2017 poz.1789. Na podstawie powyższej recenzji wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Matki i Dziecka w Warszawie o dopuszczenie mgr Katarzyny Niepokój do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Warszawa, 11 czerwca 2020r.

Prof. dr hab. med.
LECH KU[illegible]WSKI
spec. [illegible]
Warszawa, ul. [illegible] 2A/39
70213[illegible]