



Gdańsk 18.08.2023

Prof. dr hab. med. Maria Mazurkiewicz-Będziańska
Klinika Neurologii Rozwojowej
Katedra Neurologii
Gdański Uniwersytet Medyczny

Recenzja pracy doktorskiej mgr Pauliny Górki-Skoczylas pt „Analiza patologii molekularnej encefalopatii padaczkowych o charakterze kanałopatii”

W recenzowanej pracy autorka podjęła się badań nad identyfikacją podłoża molekularnego choroby u pacjentów z klinicznym rozpoznaniem encefalopatii padaczkowej (z zastosowaniem technik wysokoprzepustowych analizy DNA Encefalopatie padaczkowe i rozwojowe (DEE) są grupą ciężkich, lekoopornych zespołów padaczkowych, przebiegających z zaburzeniami neurorozwojowymi. Stanowią pod względem podłoża genetycznego heterogenną grupę jednostek o wczesnym wieku zachorowania i często poważnym rokowaniu dla pacjentów. Ewolucja ich obrazu klinicznego utrudnia jednoznaczne rozpoznanie na wczesnych etapach wystąpienia choroby co może przekładać się na postępowanie terapeutyczne. Identyfikacja powiązania szeregu chorób z tej grupy z mutacjami w konkretnych genach (obecnie ponad 100 wg OMIM) przekłada się na możliwość wczesnego postawienia diagnozy u pacjenta, uniknięcia nieprawidłowej farmakoterapii i coraz częściej zastosowania terapii spersonalizowanej

Praca, którą przedstawiono mi do recenzji ma typowy, poprawny układ rozprawy doktorskiej. Zawarta jest na 222 stronach. Układ pracy jest typowy, praca

zawiera podstawowe rozdziały Wstęp, Cele pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie i Wnioski. Prace uzupełnia Spis skrótów, tabel i rycin umieszczony na początku oraz Piśmiennictwo (183 pozycje, z czego ponad 1/4 z ostatnich pięciu lat). Istotną część pracy stanowią Aneksy zawierające bardzo szczegółowe dane wynikowe oraz szczegóły metodologiczne. Redakcyjny podział na rozdziały i ich wzajemne proporcje nie budzą zastrzeżeń. Drobne błędy edytorskie dotyczą np. numeracji rycin- (rycina 43 – numerowana dwukrotnie!)

Wstęp stanowi wprowadzenie do analizy dalszej części rozprawy oraz uzasadnia kierunek prowadzonych badań, wskazując jak wpisują się w nurt prowadzonych obecnie analiz nad podłożem genetycznego/molekularnego zespołów padaczkowych, a w szczególności zespołów z grupy encefalopatii padaczkowych i rozwojowych. Autorka pokazuje jak ewolucja technologiczna w podejściu do analizy DNA poprzez upowszechnienie nowego narzędzia jakim jest sekwencjonowanie następnej generacji (NGS) doprowadziła do rewolucji w badaniach nad podłożem molekularnym wielu chorób genetycznie uwarunkowanych w tym właśnie tej grupy. Wykazuje również, że poznawanie korelacji kliniczno-molekularnych w miarę charakterystyki nowych grup pacjentów jest procesem ciągłym prowadzącym do wyodrębniania nowych zespołów, jak to miało miejsce ostatnio (rok 2022) dla nowych jednostek *SCN1A*-zależnych, co świadczy o aktualnej wiedzy autorki odnośnie zagadnienia.

Autorka w streszczeniu i w dalszej części pracy podaje że „wśród zidentyfikowanych genów padaczkowych” dominującą grupę stanowią geny kodujące białka kanałów jonowych oraz ich podjednostki. Dlatego też DEEs określa się często jako kanałopatie. Rzeczywiście pod względem częstości w populacji dominują kanałopatie, ale to zbyt duże uproszczenie. Geny zidentyfikowane w DEE są zaangażowane w różne funkcje, w tym migrację, proliferację i organizację komórek, pobudliwość neuronów oraz transmisję synaps i plastyczność. Ogółem kanałopatie to około 40% wszystkich rodzajów DEEs, choć fakt większość nie-kanałopatii jest ultraradka (za wyjątkiem *CDKL5*, *TSC1* itp.).

W pracy doktorantka podjęła próbę identyfikacji podłoża molekularnego wysoko heterogennej grupy chorób oraz próbę określenia stopnia zaangażowania

genów kodujących białka kanałów jonowych w patogenezę DEEs. Badania zostały przeprowadzone dla kohorty polskich pacjentów (115 pacjentów, 51 z rozpoznaniem niesklasyfikowanej encefalopatii padaczkowej, 64 badanych z określonym zespołem padaczkowym). Nie do końca jasne są dla mnie kryteria klasyfikacji klinicznej (np. jak rozróżniano klinicznie zespół Dravet i zespół Dravet-like?) W kwestionariuszu użytym do badania klasyfikacja zespołów padaczkowych jest nieaktualna ale wynika to pewnie z faktu, że na etapie konstruowania pracy obowiązywała jeszcze stara klasyfikacja.

Istotny jest również moment, w którym doktorantka prowadziła prace - wprowadzenie NGS jako podstawowej metody badawczej. W niniejszej pracy skutkowało to zmianą metodyki i zaprojektowaniem, a następnie wdrożeniem autorskiego, zaprojektowanego przez Doktorantkę, panelu 49 genów związanych z wystąpieniem EEs/DEEs – EIEE v.1/2016 (zostało to szczegółowo przedstawione w rozdziale Materiały i Metody). Zastosowanie tego panelu pozwoliło na uzyskanie 36% wydajności diagnostycznej u badanych pacjentów, a analiza uzyskanych wyników wykazała, że geny najistotniejsze dla patogenezy DEE zidentyfikowano w badaniach przed wprowadzeniem NGS jak i we wczesnych pracach z zastosowaniem tej metody. Powodują one najczęstsze formy EE/DEE i powinny zawsze znajdować się w panelach genowych do analizy DEE. Doktorantka wykazała również, że badanie panelowe NGS może być zastosowane w diagnostyce DEE jako badanie pierwszego rzutu i przy dobrej ocenie klinicznej pacjenta podczas kwalifikacji daje dobrą wydajność diagnostyczną. Poszerzenie analizy o sekwencjonowanie eksomowe (WES) wiązać się powinno się z pogłębieniem analizy danych klinicznych.

Niejasne jest dla mnie jednak stwierdzenie zawarte w streszczeniu str 12 – „Badania z wykorzystaniem NGS umożliwiają zastosowanie strategii najpierw genotyp...”odwrotne fenotypowanie” tym samym autorka sama sobie zaprzecza pisząc, że najważniejszy jest dobór pacjentów i klinika. Odwrotne fenotypowanie (najpierw robimy genetykę a potem patrzymy czy się zgadza fenotyp) nie sprawdziło się w praktyce klinicznej. Okazało się, że bez dokładnej charakterystyki klinicznej nie da się dobrze zinterpretować wyników badań wysokorzepustowych co potwierdza całość pracy doktorskiej i wnioski

Interesująca jest kwestia reanalizy danych podniesiona przez autorkę. Zwraca ona uwagę na fakt, że diagnostyka jest prowadzona dla wiedzy genetycznej „tu i teraz” – dane są weryfikowane w bazach danych, na których analiza jest oparta. W związku z tym jak konkluduje Doktorantka, reanaliza danych dotyczyć powinna nie tylko WES, ale i badań panelowych (szczególnie przy zidentyfikowanych zmianach niepewnych – VUS). W pracy podkreślany jest problem konieczności poznania ograniczeń metodologicznych, wymagających opracowania algorytmu przeprowadzania badań dodatkowych i uzupełniających zarówno w odniesieniu do rozpoznania klinicznego jak i wytypowanych genów, ale także znajomości podłoża molekularnego (rodzaje mutacji) poszczególnych jednostek chorobowych, co pozwala na zaproponowanie odpowiedniej ścieżki diagnostycznej. Analizując te zagadnienia Doktorantka nawiązuje do prowadzonej na wielu forach dyskusji – czy ośrodki wykonujące badania genomowe/eksomowe powinny się specjalizować w określonych grupach jednostek chorobowych.

Wszystkie powyższe kwestie rozpatrywane są w kontekście uzyskanych wyników przedstawionych klarownie i szczegółowo w tak zatytułowanym rozdziale. Autorka w pierwszej ich części prezentuje charakterystykę zaprojektowanego panelu oraz dane pozwalające na ocenę wiarygodności co przy uwzględnieniu ograniczeń metody i opracowaniu schematu badań dodatkowych pozwala na wykorzystanie go w założonych w celach badawczych - *ustalenia podłoża molekularnego zespołów z grupy encefalopatii padaczkowych i rozwojowych dla kohorty polskich pacjentów oraz oceny zaangażowania poszczególnych genów w patogenezę tych zespołów*. W dalszej części rozdziału Doktorantka szczegółowo strategią analizy i charakterystyką wariantów zidentyfikowanych w badanych genach pod względem ich potencjalnej patogenności z podziałem na patogenne, potencjowanie patogenne i VUS (szczegółowe dane dotyczące wariantów zostały umieszczone w Aneksach). Dane dotyczą wyników badania panelowego oraz grupy pacjentów możliwe było rozszerzenie badań o analizę eksomową.

Jednym z założonych celów pracy było - *określenie stopnia zaangażowania genów kodujących białka kanałów jonowych w patogenezę encefalopatii padaczkowych i rozwojowych*. Doktorantka wykazała, że pomimo udziału w patogenezie EEs/DEEs wielu ścieżek biologicznych, ta grupa genów stanowi ich

znaczną część - warianty patogenne/potencjalnie patogenne/VUS zidentyfikowane w genach kodujących kanały jonowe stanowiły 52,6% wszystkich. Warianty w „genach kanałopatii” stanowiły również główną przyczynę molekularną DEEs u badanych pacjentów, co potwierdza istotną rolę tej grupy genów w etiopatogenezie DEEs. Najliczniejszą grupę wariantów patogennych zidentyfikowano w genie *SCN1A*. Choroby *SCN1A*-zależne (głównie o fenotypie DRVT) zidentyfikowano u 22,4% pacjentów z diagnozą molekularną. Uzyskane przez doktorantkę wyniki wskazują, że *SCN1A* jest jednym z ważniejszych genów przyczynowych w grupie EEs/DEEs w kohorcie polskich pacjentów.

Uzyskana w pracy wysoka skuteczność identyfikacji podłoża molekularnego metodą sekwencjonowania panelowego, uzasadnia zastosowanie tej metody, jako pierwszego testu w diagnostyce DEEs. Opracowany panel mógł zostać włączony do badań nad podłożem molekularnym encefalopatii padaczkowych i rozwojowych co stanowiło podstawę opracowania algorytmu diagnostyki molekularnej w przypadku rozpoznania klinicznego encefalopatii padaczkowej, stanowiąc realizację celu praktycznego założonego w pracy.

Wydaje się, że wysoki odsetek rozpoznań pomimo małego panelu (jedynie 49 genów)- głównie dlatego, że kwalifikowane były tylko dzieci z DEE (Dravet, z Doosego, Ohtahary), czyli najcięższym fenotypem. Na str 124 autorka pisze, że zwiększenie liczby genów w panelu nie podnosi istotnie wydajności. Jak to się ma do obecnych rekomendacji (Smith i wsp 2023) PMID: 36281494 DOI: 10.1002/jgc4.1646 oraz w świetle wyników metaanaliz w padaczkach- (Sheidley i wsp. 2022) PMID: 34893972 DOI: 10.1111/epi.17141, które mówią, że najwyższy odsetek rozpoznań daje WES/WGS i duży panel?

Mały panel jest dobry dla najciężej chorych dzieci(noworodki, małe niemowlęta), natomiast nie można pominąć dzieci z padaczką i mniejszymi deficytami, czyli tak zwanymi chorobami neurorozwojowymi z padaczką, gdyż tu heterogenność genetyczna jest dużo większa, warto byłoby podkreślić to w pracy

Wyniki zostały wyczerpująco omówione w Dyskusji, gdzie autorka umiejętnie odniosła je do danych literaturowych, a ponadto umiejętnie połączyła uzyskane dane i obserwacje.

Pracę podsumowuje szereg wniosków, które odnoszą się do wyników i doświadczeń zdobytych w trakcie realizacji projektu. Wnioski odpowiadają wyznaczonym celom pracy.

Rozprawę doktorską mgr Pauliny Górki-Skoczylas oceniam bardzo wysoko analiza zagadnień objętych tematem pracy doktorskiej została przeprowadzona bardzo starannie, z dużym nakładem pracy.

Wniosek końcowy

W opiniowanej rozprawie doktorskiej mgr Paulina Górka-Skoczylas wykazała się szeroką wiedzą i znajomością podejmowanej problematyki. W prezentowanej pracy wiedzę tę w sposób twórczy rozwinęła uzyskując wyniki ważne zarówno z naukowego jak i praktycznego punktu widzenia. Wykazała się również umiejętnością organizowania i samodzielnego prowadzenia badań naukowych.

Poziom naukowy przedstawionej pracy jest wysoki.. Uważam że praca mgr Pauliny Górki-Skoczylas stanowi duży wkład w kompleksową diagnostykę a co się z tym wiąże opiekę nad chorymi z encefalopatiami padaczkowymi. Praca spełnia warunki określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 o tytule naukowym i stopniach naukowych (Dz.U. 2017 poz 1789) i dlatego stawiam wniosek o dopuszczenie pracy mgr Pauliny Górki-Skoczylas do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Handwritten signature of Maria Mazurkiewicz-Beldzińska in black ink, featuring a large, stylized initial 'M' and a cursive script.

Maria Mazurkiewicz-Beldzińska