INSTYTUT „POMNIK – CENTRUM ZDROWIA DZIECKA"
ZAKŁAD GENETYKI MEDYCZNEJ
04-730 Warszawa, Al. Dzieci Polskich 20
Tel. 22 815 74 50, Fax: 22 815 74 57, e-mail: k.chrzanowska@ipczd.pl

RECENZJA

Rozprawy na stopień doktora nauk medycznych
mgr inż. Katarzyny Niepokój

pt. *„Analiza genetyczna i molekularna niesyndromicznych postaci niedosłuchu. Próba identyfikacji genów i mutacji odpowiedzialnych za dziedziczną postać choroby."*

Promotor: Prof. dr hab. Jerzy Bal

Niedosłuch to zaburzenie ze strony narządu słuchu spowodowane defektem przewodzenia lub(i) odbioru dźwięków, które można scharakteryzować i klasyfikować na wiele sposobów, uwzględniając m.in. lokalizację czy głębokość uszkodzenia, etiologię (wrodzony lub nabyty), przyczynę w odniesieniu do niedosłuchu wrodzonego (podłoże genetyczne lub wpływ czynników środowiskowych w przebiegu ciąży), czas wystąpienia w odniesieniu do stadium opanowania języka,

Szacuje się, że wrodzony głęboki niedosłuch występuje z częstością ~1 na 1000 żywych urodzeń, a ponadto u 1 na 1000 dzieci niedosłuch ujawnia się zanim osiągną dorosłość. Z danych WHO (2017) wynika, że na świecie niedosłuch występuje u ponad 360 mln osób, w tym u 32 mln dzieci. Niedosłuch stanowi zatem nie tylko globalny problem medyczny, ale też społeczny.

Niedosłuch uwarunkowany genetycznie najczęściej ujawnia się w 1 r.ż., tj. w tzw. okresie przedlingwalnym (80%), jako defekt izolowany (80%). W przeważającej większości przypadków genetycznych niedosłuch dziedziczy się monogenowo, tj. w sposób autosomalny recesywny (80%), autosomalny dominujący (19%) lub sprzężony z chromosomem X, a w niewielkim odsetku (~1%) mitochondrialnie albo wielogenowo / wieloczynnikowo, tzn. w wyniku wzajemnego oddziaływania czynników genetycznych i środowiskowych.

Niedosłuch może występować w formie izolowanej (tzw. niedosłuch niesyndromiczny) lub z towarzyszącymi dodatkowymi cechami klinicznymi i(lub) wadami wrodzonymi układającymi się w określony zespół chorobowy (tzw. niedosłuch syndromiczny).

Według aktualnie dostępnych źródeł wiadomo, że za największy odsetek przypadków izolowanego niedosłuchu odbiorczego odpowiadają zmiany w genach *GJB2* i *GJB6* (locus DNFB1) (zależnie od populacji 10-40%). Wprowadzenie nowych technologii wielkoskalowych badań molekularnych, takich jak sekwencjonowanie nowej generacji (NGS), umożliwiło zidentyfikowanie ponad 100 genów związanych z izolowanym niedosłuchem. Jak można się było spodziewać, okazało się, że nie tylko izolowany niedosłuch charakteryzuje się ogromną heterogennością genetyczną i fenotypową. W katalogu OMIM znajdziemy opisy ponad 400 zespołów, w których oprócz innych objawów klinicznych występuje niedosłuch.

Mając na uwadze niezwykłą heterogenność kliniczną i genetyczną niedosłuchu, a z drugiej strony genetyczną homogenność populacji polskiej, na tle innych populacji europejskich, wybór tematu był nie tylko trafny i uzasadniony, ale także niezwykle interesujący z uwagi na dostęp do nowych technologii wielkoskalowych, jak np. sekwencjonowanie następnej generacji; ang. *Next Generation Sequencing*; NGS) umożliwiających równoległe, jednoczasowe badanie wielu genów w trakcie jednego eksperymentu.

Przedłożona do oceny praca ma charakter monografii obejmującej łącznie 119 stron tekstu, w tym zawartych jest 18 tabel i 29 rycin oraz 4 załączniki. Układ pracy jest klasyczny, z podziałem na 9 rozdziałów oraz podrozdziały, z zachowaniem odpowiednich proporcji. Praca zawiera: spis treści, wykaz stosowanych skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, cele pracy, materiał i metody, wyniki i dyskusję. Rozprawę zamykają wnioski. Bibliografia zawiera 137 pozycji ułożonych w kolejności alfabetycznej, prawie wyłącznie anglojęzycznych, wśród których ponad 60% stanowią publikacje z ostatnich 10 lat oraz dodatkowo wykaz internetowych źródeł informacji medycznych.

Oceniając przedłożoną mi rozprawę na stopień doktora nauk medycznych, dokonam jej charakterystyki w zakresie:

1. wartości celu badawczego
2. poprawności metodycznej
3. znaczenia naukowego i praktycznego wniosków wynikających z przeprowadzonych analiz.
4. redakcji przedłożonej pracy

1. Wartość celu badawczego

We wstępie Autorka przedstawiła budowę narządu słuchu, wykorzystując bardzo przejrzyste ilustracje, następnie omówiła bardzo złożony proces fizjologicznego odbioru i przetwarzania dźwięków oraz skupiła się na przyczynach zaburzeń prowadzących do niedosłuchu częściowego lub całkowitego, który ze względu na etiologię może być wrodzony lub nabyty

Przestawiając cele pracy doktorskiej Autorka metodycznie zastosowała podział na:

(A) Cele badawcze, polegające na przeprowadzeniu molekularnej analizy podłoża dziedzicznych postaci izolowanego niedosłuchu w badanej grupie umożliwiającej podjęcie prób:

1. ustalenia podłoża molekularnego niedosłuchu w grupie badanej.
2. oceny patogenności mutacji do tej pory nieopisanych jako warianty sprawcze w patogenezie choroby.
3. zidentyfikowania genów o znaczącym udziale w patogenezie niedosłuchu u polskich chorych.

(B) Cele praktyczne, wynikające z analizy uzyskanych wyników w grupie badanej, takie jak:

1. Molekularna weryfikacja rozpoznania klinicznego niedosłuchu u pacjentów.
2. Zaprojektowanie, opracowanie i wdrożenie panelu (zestawu genów) do diagnostyki dziedzicznych przypadków niedosłuchu w wykorzystaniem sekwencjonowania następnej generacji.

3. Opracowanie nowego schematu diagnostycznego dla polskich pacjentów z niedosłuchem izolowanym.

Praca uzyskała finansowanie z Narodowego Centrum Nauki (grant nr 2014/13/N/NZ5/0367).
Na molekularne badania genetyczne uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej IMiD.

2. Poprawność metodyczna

2.1 Pacjenci, materiały i metody

Grupa badana i kontrolna

Zrekrutowana grupa badana liczyła 48 pacjentów, w tym: 25 kobiet i 23 mężczyzn (średnia wieku 21 lat, mediana 12,5 roku, odchylenie standardowe 15,5 roku) skierowanych na badania molekularne przez Poradnię Genetyczną w IMiD oraz 5 innych ośrodków z różnych regionów Polski. Kryteria włączenia do badań zostały precyzyjnie zdefiniowane (Tabela nr 6 w tekście; jednym z warunków było m.in. wykluczenie znanych patogennych wariantów w genie *GJB2*). Wywiad rodzinny obciążony utratą słuchu ustalono u 30 pacjentów (62,5%).

Jako grupę kontrolną potraktowano 200 pacjentów bez objawów niedosłuchu, u których w latach 2015-2018 wykonano w ZGM IMiD analizę molekularną metodą NGS z powodu innych wskazań.

Materiały

Przedstawiono listę odczynników i zestawów odczynników używanych do przeprowadzanych analiz. Wymieniono także aparaturę wykorzystywaną do przeprowadzenia niezbędnych procedur i reakcji, w tym posiadaną w ZGM IMiD oraz udostępnioną, w ramach współpracy, w ZGM Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (sekwenator do analizy NGS).

Metody

Materiałem biologicznym do badań molekularnych było genomowe DNA izolowane z krwi obwodowej metodą wysalania białek (wg podanego protokołu), przechowywane w temp. +4° C.

W celu wykrycia dużych zmian genomowych typu delecji/duplikacji zastosowano technikę multipleksowej amplifikacji zależnej od ligacji (MLPA) używając zestawów sond komercyjnych (MRC-Holland).

Do weryfikacji zmian zidentyfikowanych metodą NGS oraz do analizy segregacji tych wariantów u członków rodziny używano klasycznej metody sekwencjonowania DNA wg Sangera. Wykaz starterów użytych w poszczególnych reakcjach PCR został przedstawiony odpowiednio w Tabeli nr 7 (w tekście), a skład mieszanin reakcyjnych PCR i warunki reakcji PCR, odpowiednio w Tabelach nr 8 i 9 (w tekście).

Metodę sekwencjonowania następnej (nowej) generacji (NGS) opisała Doktorantka znacznie szerzej, głównie ze względu na stopień złożoności procedur przygotowawczych, jak i ciekawy, wielostopniowy proces analizy uzyskanych wyników sekwencjonowania i dochodzenia do ostatecznej weryfikacji rozpoznania.

W analizie wykorzystano dwa panele DNA: (1) komercyjny TrueSight One (TSO) (Illumina), zawierający ponad 4000 genów mających znaczenie w diagnostyce różnych chorób dziedzicznych oraz (2) autorski panel genów (panel HL) związanych przyczynowo z niedosłuchem izolowanym i syndromicznym, opracowany w ZGM IMiD. Z listy panelu TSO do analizy wybrano, 135 genów przyczynowo związanych z niedosłuchem izolowanym i syndromicznym (zgodnie bazami danych HHLH, HGMD i piśmiennictwem). Autorski panel HL zawierał sekwencje kodujące i sekwencje ekson-intron 159 genów (obie listy genów w tekście), związanych wyłącznie z niedosłuchem uzupełnionych o sondy zaprojektowane dla wybranych patogennych zmian intronowych w genie *GJB2* (lista 24 genów występujących tylko w panelu HL przedstawiona w Tabeli nr 10). Autorka przedstawiła na trzech rycinach schemat procedur niezbędnych do uzyskania surowych danych z sekwencjonowania NGS (Ryc. nr 6) oraz ich dalszej kilkuetapowej analizy bioinfornatycznej umożliwiającej priorytetyzację wariantów pod kątem ich patogenności w konkretnym przypadku (Ryc. nr 7 i 8). Ustalenie wariantu/ów patogennego/ych wymaga potwierdzenia ich obecności innymi metodami (sekwencjonowanie wg Sangera, MLPA) u osoby badanej oraz, jeśli to możliwe, przeprowadzenia analizy segregacji wariantu/ów u członków rodziny. W tekście wymienione zostały także narzędzia bioinformatyczne (bazy i programy predykcyjne) niezbędne do prawidłowej klasyfikacji wariantów pod kątem ich patogenności oraz internetowe bazy danych pomagające ustalić, na podstawie analizy genotyp-fenotyp, ostateczną przyczynę zdiagnozowanego defektu.

Stwierdzam, że przedstawione i zastosowane różnorodne nowoczesne techniki analizy spełniają kryteria dobrej praktyki laboratoryjnej.

2.2 Wyniki

Uzyskane wyniki Doktorantka starannie opracowała i opisała na 37 stronach, dodając w tekście tabele oraz ryciny (m.in. 14 rodowodów). Łącznie poddano badaniom 48 pacjentów. Zastosowanie do analizy NGS dwóch różnych paneli, komercyjnego eksomu klinicznego (TSO) i autorskiego, opracowanego w ZGM IMiD (HL) automatycznie spowodowało podział na dwie podgrupy badane, liczące odpowiednio 16 (TSO) i 32 (HL) osób.

Odsetek wyników pozwalających na ustalenie podłoża niedosłuchu był zbliżony dla obu paneli, choć nieco wyższy w przypadku TSO (43,75%) w porównaniu z panelem HL (37,5%). Warto jednak podkreślić, że średnia wykrywalność w obu grupach łącznie była zbliżona do 40%. Atutem panelu przygotowanego „na wymiar" okazało się uzyskanie lepszego pokrycia w regionach analizowanych, ograniczenie kosztów oraz skrócenie czasu analizy, dzięki ograniczeniu jej tylko do genów zaangażowanych w patogenezę niedosłuchu (ograniczenie identyfikacji tzw. wariantów przypadkowych). Wyniki genotypowania DNA 19 pacjentów (39,6% badanej grupy), u których udało się zidentyfikować warianty patogenne odpowiedzialne za molekularne podłoże niedosłuchu przedstawione zostały w tabeli 11.

U pozostałych badanych, w tym u 20 chorych nie udało się ustalić genetycznego podłoża niedosłuchu, natomiast u kolejnych 9 nie było możliwe jednoznaczne rozstrzygnięcie przyczynowego związku wykrytych zmian z utratą słuchu. Do wyników tych 29 pacjentów Autorka odniosła się w dyskusji, wyjaśniając potencjalne przyczyny „niepowodzeń".

Zidentyfikowane 33 patogenne warianty (allele) występowały w 13 genach, w tym tylko w trzech u więcej niż jednej osoby (*STRC, USH2A i MYO7A*). W 6 genach wykryto 7 nowych, dotychczas nieopisanych wariantów (analiza bioinformatyczna pod kątem ich patogenności w patogenezie niedosłuchu została przedstawiona w tabeli 12). Bardzo interesującym okazało się stwierdzenie, że wśród 33 zidentyfikowanych wariantów patogennych aż 39% stanowiły delecje, a w szczególności delecje genu *STRC*, które stanowiły 69% wszystkich delecji.

Rodowody 14 rodzin, w których została przeprowadzona analiza segregacji wariantów wykrytych u probantów przedstawiono na odpowiednich rycinach, co pozwoliło na zwrócenie uwagi na bardzo interesujące ustalenie w kilku rodzinach, w których zidentyfikowano podlegające segregacji patogenne warianty w dwóch różnych genach odpowiadających za utratę słuchu, co ma istotne znaczenie dla poradnictwa genetycznego.

Szczegółowa analiza korelacji genotyp-fenotyp zmian zidentyfikowanych w 8 genach została przedstawiona w obszernej tabeli 13 (opisy uszeregowano wg alfabetycznej kolejności genów), zwracając uwagę na wynikające z niej 3 warianty konkluzji: (1) potwierdzenie rozpoznania klinicznego, (2) sugestia zmiany rozpoznania niedosłuchu niesyndromicznego na niedosłuch syndromiczny (36,8%), z podpowiedzią uwzględnienia w analizie różnicowej kilku od jednego do kilku zespołów oraz (3) zalecenie ponownej ewaluacji klinicznej w celu ustalenia pełnej korelacji genotyp-fenotyp, z uwagi na heterogenność fenotypową objawów klinicznych przypisywaną kilku zespołom oraz różny wiek pojawiania się niektórych cech klinicznych.

W grupie kontrolnej, którą stanowili wybrani losowo anonimowi pacjenci, bez objawów niedosłuchu, przeprowadzono analizę częstości zidentyfikowanych w 13 genach zmian patogennych powiązanych przyczynowo z niedosłuchem w grupie badanej.

3. Wartość naukowa i praktyczna wniosków wynikających z przeprowadzonych analiz.

Oceniając całość pracy pragnę zwrócić uwagę na bardzo rzetelne i wnikliwe opracowanie uzyskanych wyników, zarówno opisowe, jak i graficzne oraz tabelaryczne. Niezwykle interesującym etapem jest przeprowadzenie analizy genotyp-fenotyp, która ma kluczowe znaczenie w ustaleniu ostatecznego rozpoznania i nierzadko wymaga współudziału lekarza kierującego pacjenta na badanie.

W dyskusji Doktorantka odniosła się do liczebności badanej grupy, która jakkolwiek nie była zbyt duża (48 osób z klinicznie rozpoznanym izolowanym niedosłuchem), ale wystarczająca do uzyskania kilku ważnych i ważnych wyników, wśród których wymieniłabym:

- Wykrycie w badanej grupie 7 nieopisanych do tej pory wariantów w 6 genach powiązanych z niedosłuchem (*STRC,MYO6, GATA3, HARS2, MYO15A, CDH23*),
- Uzasadnione sugestie zmiany rozpoznania klinicznego u kilkorga pacjentów,

- Współwystępowanie obok wariantów sprawczych dodatkowych patogennych wariantów w innych genach, także mających związek z niedosłuchem, które mogą mieć ewentualne znaczenie kliniczne w przyszłości, zwłaszcza w związku z planami prokreacyjnymi,
- Zwrócenie uwagi na wysoką częstość występowania delecji, zwłaszcza w genie *STRC*.

Jako podsumowanie realizacji założonych celów Doktorantka sformułowała cztery wnioski, które moim zdaniem potraktowała zbyt ogólnikowo i lakonicznie. Moim zdaniem przedstawienie wniosków jako wynikających z realizacji wstępnie założonych celów, z podziałem na badawcze i praktyczne dałoby pełniejszy obraz podsumowujący. Opracowana propozycja modyfikacji algorytmu diagnostycznego, umieszczona tylko w tekście, stałaby się bardziej widoczna i wyrazista.

Stwierdzam, że Doktorantka sprostała podjętemu wyzwaniu przeprowadzenia analizy podłoża genetycznego dziedzicznego niedosłuchu izolowanego w badanej grupie pacjentów. Przedstawione wyniki mają wartość zarówno naukową, jak i praktyczną. Wnikliwie przeprowadzona analiza genotypowo-fenotypowa wnosi ważne informacje, zarówno dla pacjenta, jak i lekarza. Przedstawione wyniki zachęcają do podjęcia dalszych badań w szerszej populacji.

4. Redakcja przedłożonej pracy (Uwagi recenzenta)

Oceniana praca doktorska została niezwykle starannie przygotowana zgodnie z wymogami dokumentacji naukowo-badawczej. Mocną stronę stanowią liczne tabele i ryciny. Warto także podkreślić, że praca została napisana dobrą polszczyzną, dzięki czemu czyta się ją z dużą przyjemnością.

Nie mam zastrzeżeń merytorycznych do recenzowanej pracy, ale mam kilka uwag o charakterze redakcyjnym, do uwzględnienia przed publikacją wyników.

- Zgodnie z rekomendacjami proponowałabym używać raczej określeń typu wariant patogenny niż mutacja.
- Być może nie znam nowych zasad przedstawiania bibliografii, ale zdziwiło mnie podawanie nazwiska tylko pierwszego autora; zwykle spotykałam się wymaganiem, aby uwzględnić co najmniej trzech pierwszych autorów, albo wszystkich;
- Zabrakło mi spisu tabel i rycin.
- S. 48, ostatnie zdanie: brakuje doprecyzowania, że Autorka ma myśli … „zidentyfikowane nowe warianty …
- Tabela 12. Objaśnienia skrótów – powinien być Zał. 2., nie 4.

WNIOSKI KOŃCOWE

Biorąc pod uwagę zarówno aspekt naukowy pracy, w tym wartość merytoryczną, jak również wnioski praktyczne wynikające z jej realizacji, merytoryczną dyskusję z wykorzystaniem właściwie wybranego piśmiennictwa oraz bardzo staranną szatę graficzną **oceniam pracę jako spełniającą warunki stawiane rozprawom na stopień doktora nauk medycznych**" określone art. 13 ust. 1 Ustawy z dn. 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2017 poz. 1789).

Na tej podstawie **zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu matki i Dziecka w Warszawie z wnioskiem o dopuszczenie mgr inż. Katarzyny Niepokój do dalszych etapów przewodu doktorskiego**.

Krystyna Chrzanowska

Prof. dr hab. n. med. Krystyna H. Chrzanowska
Kierownik Zakładu Genetyki Medycznej IPCZD

Warszawa, 5 października 2020 r.