



Poznań, dn. 25.03.2024r.

dr hab. n. med. Ewelina Bukowska-Olech
Uniwersytet Medyczny
im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu
ul. Fredry 10
61-704 Poznań

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Leny Rutkowskiej pt.:

„Analiza podłoża molekularnego wybranych dyslipidemii pierwotnych z zastosowaniem technologii sekwencjonowania następnej generacji”

Przedstawiona do recenzji praca doktorska dotyczy interesującego zagadnienia dyslipidemii pierwotnych, które stanowią heterogenną grupę wrodzonych zaburzeń gospodarki lipidowej człowieka. Pani mgr Lena Rutkowska podjęła się diagnostyki tych chorób metodami genetyki medycznej, co nie jest w Polsce rutynowo wykonywane i wskazuje na **oryginalność przeprowadzonych przez nią prac badawczych**.

Analiza przebiegu edukacji i kariery zawodowej Doktorantki wskazuje na jej pełne przygotowanie merytoryczne i warsztatowe do poprawnego rozwiązania podjętego problemu badawczego. Pani mgr Lena Rutkowska jest absolwentką analityki medycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, od roku 2016 pracuje w Zakładzie Genetyki Instytutu „Centrum Zdrowia Matki Polki” w Łodzi – w latach 2016-2022 na stanowisku młodszego asystenta, a od roku 2022 na stanowisku asystenta. Była również zaangażowana w dwa projekty naukowe, jeden finansowany ze środków Instytutu „Centrum Zdrowia Matki Polki”, drugi przez Narodowe Centrum Nauki (NCN). W 2022 roku dołączyła do międzynarodowego, wieloosobowego zespołu badawczego pod przewodnictwem Pani dr Magdy Rybak-Krzyszkowskiej i prowadzi badania w zakresie diagnostyki prenatalnej z wykorzystaniem technik biologii cytomolekularnej. Obecnie jest w trakcie realizacji szkolenia specjalizacyjnego z laboratoryjnej genetyki medycznej (rozpoczętego w 2022 roku). Doktorantka wykazuje się również dodatkową aktywnością naukową – brała czynny udział w konferencjach naukowych o zasięgu krajowym lub międzynarodowym.

OCENA FORMALNA ROZPRAWY

Recenzowana praca doktorska pt.: „Analiza podłoża molekularnego wybranych dyslipidemii pierwotnych z zastosowaniem technologii sekwencjonowania następnej generacji” stanowi cykl trzech powiązanych tematycznie prac oryginalnych o łącznych punktach oddziaływania (ang. impact factor; IF) 10,600 oraz punktach Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW) wynoszących 270. We wszystkich tych pracach Doktorantka jest pierwszym autorem, a w dwóch z nich dzieli autorstwo korespondencyjne. Wkład Doktorantki w powstanie publikacji został oszacowany na 70% (Publikacja 1 i 2) lub 75% (Publikacja 3), co wskazuje na znaczny udział w powstanie ww. artykułów naukowych. Szczegółowy udział Doktorantki w powstanie prac naukowych polegał na pozyskaniu finansowania, zaplanowaniu badań, wykonaniu badań, optymalizacji i analizie wyników przeprowadzonych analiz biologii molekularnej oraz napisaniu manuskryptów wraz z przygotowaniem tabel i rycin. Opublikowane wyniki badań zostały zrealizowane w ramach projektów naukowych, finansowanych przez Instytut „Centrum Zdrowia Matki Polki” (kierownik projektu: mgr Lena Rutkowska) i NCN – Opus (kierownik projektu: dr hab. n. med. Agnieszka Gach, Prof. Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi).

Układ przedstawionej pracy doktorskiej jest prawidłowy – zawiera *Stronę tytułową, Spis treści, Wykaz stosowanych skrótów, Wykaz publikacji, Cele badań, Metodykę, Omówienie wyników przedstawionych w cyklu publikacji, Podsumowanie, Wnioski, Piśmiennictwo, Streszczenie w języku polskim, Streszczenie w języku angielskim, Opublikowane prace oraz Zgodę Komisji Bioetycznej*. Pod względem edytorskim praca została wykonana starannie i przejrzyście, jedynym minusem jest brak spisu tabel 1-3, które znajdują się w części teoretycznej pracy. Praca zawiera kilka błędów językowych, opisanych w części *Uwagi i komentarze*. **Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.2023.742 t.j.).**

OCENA WARTOŚCI MERYTORYCZNEJ ROZPRAWY

Pani mgr Lena Rutkowska w cyklu trzech publikacji, będących wynikiem dwóch projektów naukowych przedstawiła wyniki badań genetycznych, które były przeprowadzone w grupie 139 pacjentów z podejrzeniem występowania dyslipidemii pierwotnej. Publikacje te stanowią jednolity tematycznie cykl, w których Doktorantka przedstawiła zwięzłe zagadnienie dyslipidemii pierwotnych, opis prowadzonych badań, rezultaty wraz z ich wyczerpującą dyskusją odnoszącą się do aktualnej i prawidłowo dobranej bibliografii.

W opublikowanych artykułach naukowych zawarto liczne tabele i ryciny, które zostały przygotowane bardzo starannie.

W części teoretycznej pracy doktorskiej przedstawiono wyczerpująco informacje dotyczące dyslipidemii pierwotnych, w kolejnych częściach scharakteryzowano grupę badaną, uwzględniając kryterium włączenia do badań, przedstawiono zastosowane metody diagnostyczne oraz opisano analizę bioinformatyczną uzyskanych wyników. Określono również szczegółowe cztery cele badawcze, a następnie sformułowano wnioski. Rozprawa doktorska potwierdza ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki i wskazuje na jej opanowanie warsztatu metodologicznego. Podjęty przez Doktorantkę temat badawczy jest oryginalny, a uzyskane przez nią wyniki wskazują na zasadność przeprowadzania diagnostyki genetycznej w grupie pacjentów z podejrzeniem dyslipidemii pierwotnej. Powyższe może mieć zastosowanie praktycznie, ponieważ diagnostyka genetyczna umożliwiłaby identyfikację bezobjawowych pacjentów, którzy następnie mogliby być objęci odpowiednimi poradnictwem i opieką medyczną, jeszcze przed pojawieniem się niekorzystnych zmian lipidogramu czy nieprawidłowego fenotypu.

Doktorantka wskazała cztery cele szczegółowe prowadzonych badań, a ich realizacji podjęła się w Publikacjach 1-3:

1. *Analiza podłoża genetycznego hipercholesterolemii rodzinnej w populacji polskiej wśród pacjentów pediatrycznych*
2. *Ocena przydatności metody sekwencjonowania następnej generacji w diagnostyce dyslipidemii pierwotnych*
3. *Ocena skuteczności narzędzia bioinformatycznego DECoN do identyfikacji zmian liczby kopii (CNV) z danych uzyskanych po NGS*
4. *Charakterystyka porównawcza dwóch najczęstszych typów wrodzonej lipodystrofii częściowej (FPLD2 oraz FPLD3) z uwzględnieniem podłoża genetycznego oraz następstw metabolicznych. Poszukiwanie nowych wariantów patogennych w genach LMNA oraz PPARG.*

W Publikacji 1 zatytułowanej „Identification of new genetic determinants in pediatric patients with hypercholesterolemia using a custom NGS panel” Doktorantka opisuje wyniki analiz sekwencjonowania następnej generacji (ang. next generation sequencing; NGS) unikalnego panelu genowego (Truseq; Illumina) zaprojektowanego na potrzeby prowadzonych badań. Panel genowy obejmował 21 genów związanych z występowaniem

dyslipidemii pierwotnych i innych pierwotnych nieprawidłowości gospodarki lipidowej człowieka. Badania potwierdzające wykonano sekwencjonowaniem Sangera. Grupę badaną stanowiło 57 pacjentów pediatrycznych z podejrzeniem hipercholesterolemii rodzinnej. Punktowe warianty sprawcze zidentyfikowano u 58% pacjentów w czterech genach – *ABCG5*, *APOB5*, *LDLR* oraz *LPL*. Najwięcej heterozygotycznych wariantów patogennych lokowało się w genie *LDLR*, z których najczęstszym był wariant NM_000527.4 c.1775G>A NP_000518.1 p.Gly592Glu, w tym genie zidentyfikowano również nieraportowany wcześniej wariant patogenny zmieniający ramkę odczytu kodowanego białka – NM_000527.4 c.373_379del NP_000518.1 Gln125SerfsTer79. Na uwagę zasługuje również wysoce prawdopodobne digeniczne uwarunkowanie choroby u jednego z pacjentów płci żeńskiej, u którego Doktorantka zidentyfikowała dwa heterozygotyczne warianty w genach *LDLR* (NM_000527.4 c.2416dup NP_000518.1 p.Val806GlyfsTer11) i *APOB* (NM_000384.2 c.10708C>T NP_000375.2 p.His3570Tyr). Oba warianty segregowały w rodzinie badanej pacjentki (Figure 4 w Publikacji 1). Opublikowane wyniki zostały omówione wobec aktualnej wiedzy, a także skorelowane z wynikami lipidogramów badanych pacjentów.

W Publikacji 2 zatytułowanej „Identification of new copy number variation and the evaluation of CNV detection tool for NGS panel data in Polish familial hypercholesterolemia patients” Doktorantka podjęła się identyfikacji wariantów typu zmian liczby kopii (ang. copy number variation; CNV) w grupie 103 pacjentów (w Pracy doktorskiej i publikacji wskazano, że grupa badana wynosiła 136 pacjentów, ale wliczono do niej również 33 pacjentów, u których opisano warianty sprawcze w Publikacji 1). Do badań MLPA obejmującego w zakresie swojej analizy eksony genu *LDLR* (SALSA MLPA Probemix o62; MRC-Holland) zostało włączonych 30 pacjentów, u których nie zidentyfikowano wariantów typu pojedynczego nukleotydu (ang. single nucleotide variant; SNV) metodą NGS panelu genowego, a którzy mieli najwyższe z zaraportowanych stężeń frakcji LDL. Doktorantka zidentyfikowała 10 wariantów typu CNV w obrębie badanego genu *LDLR*, z których najczęściej występującym wariantem była heterozygotyczna duplikacja eksonów 4-8. W drugiej części badań Doktorantka podjęła się oceny obecności CNV w plikach bam pochodzących z analizy NGS unikalnego panelu genowego dla dyslipidemii pierwotnych. W tym celu użyła narzędzia bioinformatycznego DECoN (ang. Detection of Exon Copy Number). W tej części analizy wytypowano dwóch kolejnych pacjentów, u których program wykazał prawdopodobną obecność heterozygotycznej duplikacji eksonów 4-8 w obrębie

genu *LDLR*. Wytypowane CNVs zostały potwierdzone w badaniu MLPA. Uzyskane wyniki wskazują na zasadność poszukiwania zmian typu CNV w grupie pacjentów z dyslipidemią pierwotną, a także potwierdzają skuteczność narzędzia DECoN w ich identyfikacji, co niewątpliwie jest bardzo cennym wnioskiem, uzyskanym na podstawie przeprowadzonych przez Doktorantkę analiz.

W Publikacji 3 zatytułowanej „Familial partial lipodystrophy – literature review and report of a novel variant in *PPARG* expanding the spectrum of disease-causing alterations in FPLD3” Doktorantka podjęła się podsumowania danych literaturowych dotyczących lipodystrofii wrodzonych ze szczególnym uwzględnieniem rodzinnej lipodystrofii częściowej (ang. Familial partial lipodystrophy; FPLD) typu 2 i 3. W drugiej części publikacji Doktorantka opisała jeden rodzinny przypadek kliniczny – pacjentki prezentującej cechy kliniczne lipodystrofii częściowej (złogi tłuszczowe na twarzy, szyi i tułowie, hirsutyzm, zanik tkanki tłuszczowej wraz z przerostem mięśni kończyn dolnych). Przeprowadzone przez Doktorantkę badanie NGS unikalnego panelu genowego (opisanego w Publikacji 1) pozwoliło na identyfikację nieopisywanego wcześniej w literaturze heterozygotycznego wariantu typu missense w genie *PPARG* NM_015869.4 c.443G>A NP_056953.2 p.Gly148Glu. Badania segregacji rodzinnej wykazały obecność ww. wariantu u kolejnych objawowych członków rodziny pacjentki, co wraz z analizą bioinformatyczną *in silico* pozwoliło uznać go za wariant patogenny i rozpoznać w rodzinie FPLD3. W dyskusji Doktorantka umiejętnie opisała uzyskane wyniki i skorelowała je z danymi literaturowymi. Ciekawym elementem dyskusji jest porównanie kliniczne dwóch bardzo rzadkich i podobnych do siebie jednostek chorobowych – FPLD2 oraz FPLD3. Jednak jak wskazała Doktorantka, dopiero badania genetyczne pozwalają na definitywne postawienie diagnozy klinicznej.

UWAGI I KOMENTARZE

Nie znajduję istotnych, merytorycznych lub formalnych nieprawidłowości w przeprowadzonych przez Doktorantkę badaniach. Jednak załączam kilka drobnych uwag dotyczących poprawności językowej pracy i kilka komentarzy, które mogą stanowić temat dyskusji naukowej:

1. Wydaje się, że niepoprawnie użyto w pracy słów – *indykator* (s. 9), *transparentnie* (s. 24, s. 28), *specyficznego* (s. 25), *gdzie* (s. 26), *dystrybucja* (s. 27); dodatkowo *ultra-rzadkie* (s. 26) powinno pisać się łącznie.
2. Rekomenduje się używanie określenia wariant zamiast mutacja.

3. Błędnie użyto określenia *mikrodelecja* (s. 31); mikrodelecją nie można nazwać delecji siedmiu nukleotydów oraz aberracja (s.26); aberracja to zmiana strukturalna lub liczbowa w obrębie chromosomów.
4. Wymieniane w tekście warianty typu SNV powinny być również opisane wg pozycji białkowej.
5. Liczba *Wniosków pracy* nie jest równa liczbie *Celów pracy*, w mojej ocenie Wniosek 5 powinien zostać włączony do Wniosku 2 lub 4.
6. W jaki sposób określenie „czynniki ryzyka” (s. 23 Pracy doktorskiej) odnosi się do klasyfikacji wariantów wg Amerykańskiego Kolegium ds. Genetyki Medycznej i Genomiki (ACMG)?
7. W Publikacji 2 Doktorantka zastosowała bioinformatyczne narzędzie DECoN do analizy CNVs w wynikach badań NGS panelu genowego, jednak nie znalazłam informacji czy były poszukiwane CNVs również w innych genach niż *LDLR*?
8. Zgodnie z Tabelą 1 pracy doktorskiej lipodystrofia wrodzona są warunkowane przez geny *LMNA*, *PPARG* oraz *PLIN1*, jednak w zaprojektowanym panelu genowym nie znalazł się gen *PLIN1*.

WNIOSEK KOŃCOWY

Przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani mgr Leny Rutkowskiej pt.: „Analiza podłoża molekularnego wybranych dyslipidemii pierwotnych z zastosowaniem technologii sekwencjonowania następnej generacji” stanowi wartościowe dzieło naukowe, które wskazuje na możliwość wdrożenia badań genetycznych w dyslipidemiach pierwotnych, zanim pojawią się zmiany w profilu lipidowym człowieka. Uwagi zawarte w niniejszej recenzji nie umniejszają wartości merytorycznej pracy, a recenzowana rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.2023.742 t.j.). W związku z powyższym **zwracam się do Rady Naukowej Instytutu „Centrum Zdrowia Matki Polki” z wnioskiem o dopuszczenie mgr Leny Rutkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego i jednocześnie gratuluję Doktorantce i Promotorowi przedstawionego osiągnięcia naukowego.**



dr hab. n. med. Ewelina Bukowska-Olech