



UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU

Wydział Lekarski
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Katedra Genetyki Klinicznej

ul. Curie Skłodowskiej 9, 85-094 Bydgoszcz
e-mail: kizgenet@cm.umk.pl, tel./fax 52 585 35 68
tel. +48 52 585 35 67, 52 585 35 77

dr hab. n. med. Magdalena Pasińska, prof. UMK
Katedra Genetyki Klinicznej
CM UMK

Recenzja
rozprawy doktorskiej pani mgr Anny Nykel
pt. "Wykorzystanie technologii digital PCR do detekcji aneuploidii u płodów -
opracowanie i implementacja nowego narzędzia diagnostycznego".

Zgodnie z uchwałą Rady Naukowej ICZMP z dnia 27.10.2021 r., o powołaniu mnie na recenzenta rozprawy, mam zaszczyt przedstawić poniższą opinię.

Podstawą rozprawy Doktorantki stanowi cykl trzech recenzowanych, oryginalnych, anglojęzycznych publikacji, o łącznym współczynniku IF 11.968 i punktacji MNiSW 280. We wszystkich wymienionych artykułach Pani mgr Anna Nykel jest pierwszym autorem, a jej wkład jest znaczący, co potwierdzają wszyscy autorzy w oświadczeniach stanowiących załączniki do niniejszej rozprawy oraz podpisane zgody na wykorzystanie prac w omawianej rozprawie doktorskiej.

Dysertacja dotyczy opracowania, walidacji i wprowadzeniu nowej metody diagnostycznej - digital PCR, do szybkiej analizy aneuploidii u płodów.

Zmiany struktury wiekowej kobiet rodzących, związanej z koniecznością uzyskania stabilizacji zawodowej i finansowej, względami socjoekonomicznymi, jak też i postępem w leczeniu niepłodności oraz coraz łatwiejszym dostępem do procedur zapłodnienia pozaustrojowego, mają wpływ na statystycznie istotny wzrost ryzyka wystąpienia u płodu aneuploidii. Jednak, mimo wzrostu ryzyka związanego z wiekiem, aż 70% dzieci z zespołem Downa rodzą kobiety przed ukończeniem 35 lat. Dlatego też, w wielu krajach wskazanie do inwazyjnych badań prenatalnych wynikające z wieku zostało zastąpione oceną indywidualnego ryzyka nieprawidłowości chromosomowych, obliczanego na podstawie wieku matki, czasu trwania ciąży, a także kombinacji markerów biochemicznych i ultrasonograficznych. Aneuploidie chromosomów 13, 18 i 21 oraz X i Y, stanowią aż ok. 80% nieprawidłowości chromosomowych, rozpoznawanych podczas ciąży.

Choroby o podłożu chromosomalnym są nieuleczalne, w większości przypadków współlistnieją z niepełnosprawnością intelektualną i wysoką śmiertelnością, a wykrycie ich pozwala

na bezpieczne prowadzenie ciąży i przewidywanie możliwych powikłań podczas jej trwania, przygotowaniu rodziców na posiadanie dziecka chorego, wdrożeniu postępowania hospicyjnego lub po urodzeniu, objęciu dziecka specjalistyczną opieką medyczną.

Klasyczne metody cytogenetyczne polegające na badaniu kariotypu konstytucyjnego, rutynowo wykonywane z amniocytów lub kosmków trofoblastu, są metodami żmudnymi i kosztownymi, polegającymi na długoterminowej hodowli komórkowej, co nie daje możliwości uzyskania w krótkim czasie wyniku. Dostępne molekularne testy wykorzystywane do szybkiej diagnostyki najczęstszych aneuploidii, mają pewne ograniczenia. Dlatego też, zagadnieniom opracowania i wdrożenia innowacyjnego narzędzia diagnostycznego - digital PCR, do szybkiej diagnostyki aneuploidii poświęciła Pani mgr Anna Nykel swoją rozprawę doktorską.

Praca została przedstawiona w sposób bardzo konkretny i przejrzysty, na który składa się: wykaz opublikowanych prac (trzy publikacje), krótki wstęp, cele, omówienie kolejnych reprintów, podsumowanie uzyskanych wyników, ostateczne wnioski, spis piśmiennictwa oraz streszczenia w języku polskim i angielskim.

We wstępie Doktorantka wprowadza czytelnika w zagadnienie częstości występowania aneuploidii u płodu oraz zapoznaje z metodami rutynowo stosowanymi do ich wykrycia. Podkreśla, że długi czas oczekiwania na wynik, wymagający założenia hodowli komórkowej, po wykonanej procedurze inwazyjnej, wzbudza niepokój i ogromny stres, u kobiety ciężarnej. Następnie, przedstawia podjętą koncepcję zastosowania metody digital PCR, podkreślając jej zalety, którymi są: bezwzględna ocena ilościowa kwasów nukleinowych oraz wysoka czułość i specyficzność, w porównaniu do powszechnie stosowanej metody *real-time* PCR.

Doktorantka wyznaczyła sobie cel główny, którym było wprowadzenie innowacyjnej metody do szybkiej diagnostyki aneuploidii u płodów. Ponadto, realizując ten projekt również cele szczegółowe, takie jak: określenie użyteczności klinicznej nowego narzędzia diagnostycznego digital PCR do detekcji aneuploidii, na podstawie czułości i specyficzności oraz dokładności metody, w przypadku występowania kontaminacji komórkami maczynymi.

Podjęta przez Doktorantkę tematyka jest bardzo aktualna i poza wymiarem badawczym posiada istotny aspekt praktyczny w opiece nad kobietą ciężarną oraz ekonomiczny, co szczególnie powinno zostać docenione przez Dyрекcję szpitala.



Całość spójnie i logicznie uzasadnia wyznaczone przez doktorantkę cele.

Materiałem do badań wybranym przez Doktorantkę był płyn owodniowy lub komórki trofoblastu, pobrane od 638 kobiet w ciąży, u których występowało podwyższone ryzyko występowania aneuploidii u płodu, na podstawie nieprawidłowych wyników biochemicznych i/lub badania USG, u których wykonano inwazyjną diagnostykę prenatalną oraz rutynową hodowlę komórkową i badanie kariotypu płodu.

Praca pt. "Chip-Based Digital PCR Approach Provides a Sensitive and Cost - Effective Single - Day Screening Tool for Common Fetal Aneuploidies - A Proof of Concept Study", opublikowana w International Journal of Molecular Science, jest pierwszym doniesieniem dotyczącym wykorzystania nowoczesnej technologii digital PCR w diagnostyce prenatalnej. Głównym celem było opracowanie i optymalizacja nowego narzędzia diagnostycznego do szybkiej oceny najczęstszych aneuploidii u płodu.

Kolejna praca pt. "Clinical Validation of Novel Chip - Based Digital PCR Platform for Fetal Aneuploidies Screening", opublikowana w Diagnostics, jest kontynuacją wcześniej przeprowadzonych badań, w której Doktorantka skupiła się na dokonaniu analizy popartej dobrze opracowanymi metodami statystycznymi, które wykazały istotnie różnice między próbkami euploidalnymi i aneuploidalnymi, krótki protokół badania i niskie koszty. Poza tym, Doktorantka wykazała, że metoda digital PCR jest dokładną i czułą metodą w wykrywaniu mozaikowości. W moim przekonaniu, publikacja ta jest najbardziej istotna z praktycznego i klinicznego punktu widzenia.

Trzecia oryginalna praca pt. "The Influence of Maternal Cell Contamination on Fetal Aneuploidy Detection Using Chip - Based Digital PCR Testing", opublikowana w Diagnostics, porusza zagadnienie kontaminacji próbki materiałem pochodzenia matczynego, co zwiększa ryzyko błędu przedanalizacyjnego i może skutkować błędną interpretacją wyników, zwłaszcza w przypadku wykorzystania metod molekularnych. Doktorantka we wstępnych wynikach wykazała, że zastosowanie nowej metody digital PCR, umożliwia identyfikację aneuploidii, nawet przy wysokim poziomie kontaminacji.

Zastosowane przez Doktorantkę metody badań - analizy genetyczne oraz statystyczna analiza danych są bardzo dobrze dobrane i nie budzą zastrzeżeń. Wyniki zostały przedstawione w sposób przejrzysty, dający pełny obraz przedstawionych badań.



Kolejną częścią dysertacji jest podsumowanie wszystkich zamieszczonych publikacji, w którym autorka tłumaczy podjętą tematykę prac.

Opracowana metoda została wdrożona w Zakładzie Genetyki Instytucie Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi i jest wykorzystywana jako badanie wstępne, umożliwiające uzyskanie wyniku w ciągu kilku godzin od pobrania materiału, co jest niezmiernie ważne dla matki, jak i dla lekarza, który musi podjąć dalsze decyzje dotyczące procesu diagnostyczno - leczniczego.

Zastosowanie platformy QuantStudio Digital PCR do detekcji aneuploidii u płodu ma charakter innowacyjny, wykorzystujący wiedzę z zakresu genetyki, metod biologii molekularnej, statystyki oraz bioinformatycznej analizy danych. Opublikowane wyniki badań są pierwszym doniesieniem na świecie, dotyczącym wdrożenia tej metody do wstępnej diagnostyki aneuploidii. Wyniki potwierdzają dużą użyteczność kliniczną oraz dokładność metody w identyfikacji aneuploidii również przy kontaminacji materiałem matczynym, co redukuje koszty i usprawnia proces diagnostyczny.

Wnioski końcowe w sposób wyczerpujący odpowiadają na wytyczone cele pracy.

Końcowe rozdziały dysertacji, to dobrze i w sposób skompensowany przedstawienie streszczenia w języku polskim i angielskim oraz spis piśmiennictwa (9 pozycji), które ze względu na brak wcześniejszych doniesień dotyczących zastosowania tej metody nie jest liczne.

Kilka drobnych uwag do Doktorantki.

Proponuję nie używać określenia "trisomia pary".

Poza tym, jako klinicysta nie mogę zgodzić się ze stwierdzeniem, że "złotym standardem" w diagnostyce prenatalnej jest metoda cytogenetyki klasycznej, ponieważ porównawcza hybrydyzacja genomowa do mikromacierzy całogenomowej (ArrayCGH), pozwala na rozpoznanie przyczyny wynikającej z niechrópowania genetycznego 5 razy częściej, niż metoda cytogenetyki klasycznej. Jest to wprawdzie metoda bardzo kosztowna, wymagająca specjalistycznego sprzętu i skomplikowanej analizy bioinformatycznej, niezbędnej do interpretacji uzyskanego wyniku, przez to jest niedostępna dla większości mniejszych laboratoriów wykonujących badania. Poza tym, w dalszym ciągu nie jest to metoda refundowana przez NFZ, na potrzeby diagnostyczne płodu, co znacznie ogranicza możliwości jej stosowania.



UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU

Wydział Lekarski
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Katedra Genetyki Klinicznej

ul. Curie Skłodowskiej 9, 85-094 Bydgoszcz
e-mail: kizgenet@cm.umk.pl, tel./fax 52 585 35 68
tel. +48 52 585 35 67, 52 585 35 77

Metoda cytogenetyki klasycznej pozwala na wykrycie aneuploidii, która zdarza się najczęściej i jest najstarszą, i do końca niezastąpioną techniką stosowaną w inwazyjnej diagnostyce prenatalnej.

W pełni doceniam (z nutą zazdrości) wieloletnie doświadczenie Zakładu Genetyki ICZMP w wykonywaniu i doskonaleniu metod prenatalnych badań inwazyjnych, a także istotny wkład koncepcyjny Promotora kierującego rozprawą wspierającego Doktorantkę w opracowaniu i wdrożeniu nowatorskiego narzędzia diagnostycznego, jakim jest digital PCR do szybkiej diagnostyki aneuploidii płodu. Proponuję wykorzystanie tej metody również do diagnostyki trofoblastu po poronieniu. Poszerzyłoby to ofertę laboratorium oraz dało możliwość diagnostyki poronień większej puli kobiet.

Podsumowując, przedstawiona mi do oceny praca doktorska pt. "Wykorzystanie technologii digital PCR do detekcji aneuploidii u płodów - opracowanie i implementacja nowego narzędzia diagnostycznego", spełnia ustawowe wymagania stawiane rozprawom na stopień doktora nauk medycznych. W moim przekonaniu praca jest nowatorska i posiada dużą wartość w aspekcie klinicznym i praktycznym.

Na tej podstawie zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej ICZMP, o dopuszczenie pani mgr Anny Nykel do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, ze względu na jej innowacyjny charakter wnioskuję o wyróżnienie rozprawy.

prof. UMK, dr hab. n. med. Magdalena Pasitka
specjalista ginekolog - położnik,
genetyk kliniczny
2199504