



**Recenzja**  
**rozprawy doktorskiej pani mgr Kingi Sałacińskiej**  
**nt. „Badanie podłoża genetycznego wrodzonej łamliwości kości z zastosowaniem**  
**metody sekwencjonowania następnej generacji (NGS)”**

Przedstawiona mi do recenzji, zgodnie z uchwałą Rady Naukowej ICZMP z dnia 22.11.2023 rozprawa doktorska, pani mgr Kingi Sałacińskiej ma formę spójnego tematycznie zbioru trzech artykułów poświęconych tematyce genetycznego podłoża rzadkiej choroby, jaką jest wrodzona łamliwość kości (OI).

Prace zostały opublikowane w recenzowanych, anglojęzycznych czasopismach, o łącznym współczynniku wpływu IF 11.972 i punktacji MNiSW 270. Dwie z prac, są artykułami oryginalnymi, natomiast jedna stanowi opis przypadku. We wszystkich wymienionych artykułach Pani mgr Kinga Sałacińska jest pierwszym autorem, a jej wkład jest znaczący, co potwierdzają wszyscy autorzy w oświadczeniach oraz zgodach na wykorzystanie prac w omawianej rozprawie doktorskiej, załączonych do niniejszej rozprawy.

Pani Kinga Sałacińska jest autorką koncepcji podjętego tematu, pozyskała środki na finansowanie prac badawczych. Jest odpowiedzialna za aspekt molekularny tj. zaprojektowanie, optymalizację i wdrożenie autorskiego panelu genów powiązanych z OI, do sekwencjonowania metodą NGS, a także za przeprowadzenie wszystkich eksperymentów.

Rozprawę uzupełnia bardzo uporządkowane i czytelne wprowadzenie do tematyki genetycznego podłoża wrodzonej łamliwości kości (OI).

We wstępie Doktorantka scharakteryzowała obraz kliniczny wrodzonej łamliwości kości i dokonała próby korelacji genotypowo – fenotypowej dla każdego podtypu choroby. Następnie, odniosła się do złożonego algorytmu diagnostycznego, omawiając poszczególne metody i ich zalety oraz ograniczenia, również z uwzględnieniem aspektu finansowego i czasowego.

Celem podjętego tematu było określenie podłoża genetycznego w grupie polskich pacjentów z wrodzoną łamliwością kości oraz poszukiwanie zmienności genetycznej w genach kolagenu typu I.



Ponadto, zaplanowano ustalenie związku genotypu z obserwowanym efektem fenotypowym oraz określenie skuteczności metody sekwencjonowania następnej generacji (NGS) w diagnostyce wrodzonej łamliwości kości (OI).

Cele badawcze zostały starannie dobrane i przedstawione w jasny i rzeczowy sposób.

Materiał badawczy i zastosowane metody zostały dobrze dobrane i umiejętnie wykorzystane, co pozwoliło na zrealizowanie postawionych zadań. Na uwagę zasługuje zebranie z licznych ośrodków w Polsce grupy badanej 198 pacjentów, ze 175 rodzin z postawionym rozpoznaniem klinicznym, tej rzadkiej i „trudnej”, z punktu widzenia diagnostycznego jak i klinicznego choroby.

Imponująca grupa badana oraz uzyskane wartościowe wyniki, które potwierdziły diagnozę u prawie 80% badanych, zostały wcześniej ocenione i docenione przez grono ekspertów – recenzentów publikacji, o charakterze międzynarodowym, co dowodzi o atrakcyjności i istotności podjętych badań.

W dalszej części rozprawy przedstawiono włączone do niej publikacje:

#### **Publikacja 1**

**Sałacińska K, Pinkier I, Rutkowska L, Chlebna-Sokół D, Jakubowska-Pietkiewicz E, Michałus I, Kępczyński Ł, Salachna D, Wieczorek-Cichecka N, Piotrowicz M, Chilarska T, Jamsheer A, Matusik P, Wilk M, Petriczko E, Giżewska M, Stecewicz I, Walczak M, Rybak-Krzyszowska M, Lewiński A, Gach A.**

*NGS analysis of collagen type I genes in Polish patients with Osteogenesis imperfecta: a nationwide multicenter study.*

Front Endocrinol (Lausanne). 2023 Sep 22;14:1149982. PMID: 37810882.

W pracy przedstawiono wyniki badania nad podłożem genetycznym wrodzonej łamliwości kości u polskich pacjentów. Była to pierwsza publikacja z Polski. Grupę badaną stanowiło 197 polskich pacjentów (180 rodzin) z podejrzeniem wrodzonej łamliwości kości, rekrutowanych przez sześć jednostek medycznych w latach 2016-2022. Jest to druga, najliczniejsza grupa badana wśród populacji europejskich. Z punktu widzenia częstości występowania OI, zaprezentowana duża grupa pacjentów w populacji polskiej ma ogromne znaczenie poznawcze.



Uzyskane wyniki podzielono na 3 główne sekcje: charakterystykę badanej populacji, analizę podłoża genetycznego oraz analizę cech fenotypowych pacjentów z potwierdzoną przyczyną choroby.

Na przykładzie badanej grupy pacjentów Doktorantka wykazała, że metoda NGS jest najbardziej kompleksowym narzędziem w diagnostyce wrodzonej łamliwości kości. Identyfikacja nowych wariantów w genach kolagenu typu I zwiększyła spektrum zmian związanych z patogenezą choroby.

## Publikacja 2

**Sałacińska K**, Pinkier I, Rutkowska L, Chlebna-Sokół D, Jakubowska-Pietkiewicz E, Michałus I, Kępczyński Ł, Salachna D, Jamsheer A, Bukowska-Olech E, Jaszczuk I, Jakubowski L, Gach A.  
*Novel Mutations Within Collagen Alpha1(I) and Alpha2(I) Ligand-Binding Sites, Broadening the Spectrum of Osteogenesis Imperfecta - Current Insights Into Collagen Type I Lethal Regions.*  
Front Genet. 2021 Jul 9;12:692978. PMID: 34306033.

W publikacji przedstawiono grupę siedmiu pacjentów z patogennymi wariantami zlokalizowanymi w „regionach letalnych” genów kolagenu typu I, opisywanych dotychczas jako miejsca związane z występowaniem najcięższej postaci wrodzonej łamliwości kości typu 2 (dotyczy wyłącznie zmian powodujących substytucję glicyny). Ze względu na fenotyp prezentowany przez pacjentów w badanej populacji polskiej – od formy łagodnej, poprzez postać o umiarkowanym nasileniu cech, po formę postępująco – deformującą, analizę poszerzono o dane pochodzące z różnych populacji dostępne w bazie OIVD.

Uzyskane wyniki zostały podzielone na cztery główne sekcje: opis kliniczny pacjentów, charakterystyka i klasyfikacja zidentyfikowanych wariantów, charakterystyka wszystkich wariantów skutkujących substytucją glicyny w obrębie „regionów letalnych”, analiza i lokalizacja wszystkich wariantów skutkujących substytucją glicyny związanych z występowaniem formy letalnej w genach *COL1A1* i *COL1A2*.

Doktorantka wykazała znaczne różnice w częstości występowania oraz nasileniu postaci choroby dla poszczególnych aminokwasów w zależności od genu.

Identyfikacja wariantów zlokalizowanych w „regionach letalnych”, u pacjentów prezentujących nieletalne formy choroby, przyczyniła się do podjęcia przez Doktorantkę szerszej



analizy korelacji genotypowo-fenotypowej. W jej wyniku ustaliła aktualną liczbę wariantów odpowiedzialnych za wystąpienie letalnej postaci wrodzonej łamliwości kości w obrębie „regionów letalnych”.

Według mojej opinii praca ta jest najbardziej wartościowa i stanowi cenne źródło informacji o wpływie genetycznego podłoża na fenotyp. Być może uzyskane wyniki pomogą w określeniu nowych czynników powodujących występowanie najcięższej formy choroby.

### Publikacja 3

Sałacińska K, Michałus I, Pinkier I, Rutkowska L, Chlebna-Sokół D, Jakubowska-Pietkiewicz E, Kępczyński Ł, Salachna D, Gach A.

*The first glycine-to-tryptophan substitution in the COL1A1 gene identified in a patient with progressively-deforming Osteogenesis imperfecta.*

Mol Genet Genomic Med. 2022 Aug;10(8):e1996. PMID: 35748117.

W pracy przedstawiono pacjentkę z postępująco-deformującą postacią wrodzonej łamliwości, u której opisano pierwszą substytucję glicyny na tryptofan zlokalizowaną w genie *COL1A1*. Opis przypadku klinicznego jest dopełnieniem całości badań nad korelacją genotypowo – fenotypową, u pacjentów z wrodzoną łamliwością kości. Opisany w niej wariant dostarcza nowych istotnych informacji na temat wpływu danego typu aminokwasu na obraz kliniczny pacjenta.

Zastosowane przez Doktorantkę metody badań - analizy genetyczne oraz statystyczna analiza danych są bardzo dobrze dobrane i nie budzą zastrzeżeń, co dowodzi znajomości i praktycznej umiejętności w zakresie zastosowanych technik badawczych.

Doktorantka zaprojektowała i wdrożyła autorskie narzędzie do jednoczesnej analizy kilkudziesięciu genów, o ugruntowanej roli w patogenezie choroby, a także genów-kandydatów o potencjalnie możliwym związku z OI. O naukowym charakterze badań świadczy zidentyfikowanie 40 nowych nieopisanych wcześniej wariantów genów kolagenowych i niekolagenowych warunkujących wystąpienie różnych postaci choroby, i opublikowane ich w domenie międzynarodowej bazy danych ClinVar, co stanowi cenne ogólnodostępne źródło wiedzy dla naukowców i klinicystów.

Wyniki zostały przedstawione w sposób przejrzysty, dający pełny obraz zakresu badań. Doktorantka obiektywnie omówiła i oceniła wyniki, ponadto w dojrzały sposób je przedyskutowała. Należy



podkreślić, że wartość merytoryczna pracy, swoboda poruszania się wieloma metodami badań oraz rzeczowe podsumowanie, dowodzi biegłej znajomości tematu Autorki pracy.

Doktorantka sformułowała 5 wniosków, które wynikają z przeprowadzonych badań i odnoszą się do pytań postawionych w celach rozprawy doktorskiej.

Końcowe rozdziały dysertacji, to dobrze i w sposób skompensowany przedstawienie streszczenia w języku polskim i angielskim oraz spis piśmiennictwa (27 pozycji, które ze względu na brak wcześniejszych doniesień nie jest zbyt liczne).

Pytania i uwagi do Doktorantki:

1. W rozdziale „Materiał i metody” napisała Pani, że materiał do izolacji DNA genomowego został wyizolowany, u pacjentów pastnatalnych z limfocytów krwi obwodowej, a od płodów z amniocytów. Część przypadków OI, zwłaszcza formy mozaikowe, mogą mieć łagodniejsze objawy kliniczne lub też mogą zostać nie wykryte, ze względu na mozaikowość somatyczną. Może warto byłoby w tych niewyjaśnionych przypadkach wykorzystać inną linię komórkową np. fibroblasty do diagnostyki choroby?

Wariant patogeny może powstać *de novo* albo może być odziedziczony od rodzica z mozaikowością somatyczną i/lub linii zarodkowej, co występuje u aż 16% rodzin. Każde dziecko osoby z dominującą, odziedziczoną formą *COL1A1/2-OI* ma 50% szans na odziedziczenie wariantu sprawczego i rozwój pewnych objawów OI. Proponuję uwzględnić to przy diagnostyce bezobjawowych rodziców i pobrać materiał np. z fibroblastów, lub w przypadku mężczyzn (ze względu na łatwość pobrania materiału) dokonać analizy z DNA gamet. Miałoby to ogromne znaczenie dla poradnictwa genetycznego i określeniu ryzyka genetycznego w rodzinie.

2. Ze względu na zmienną ekspresję fenotypową OI, ocena korelacji genotyp – fenotyp wymaga bardzo dużej liczby przebadanych pacjentów. Czy zatem istnieje Polski rejestr pacjentów z OI, w celu zapewnienia im lepszej opieki?



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](mailto:kizgenet@cm.umk.pl), tel./fax 52 585 35 68  
tel. +48 52 585 35 67, 52 585 35 77

Podsumowując, przedstawiona mi do oceny praca doktorska pt. „**Badanie podłoża genetycznego wrodzonej łamliwości kości z zastosowaniem metody sekwencjonowania następnej generacji (NGS)**”, spełnia ustawowe wymagania stawiane rozprawom na stopień doktora nauk medycznych. Doktorantka wykazała się umiejętnością sformułowania i rozwiązania problemu badawczego, osiągnęła cele dając dowód umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. W moim przekonaniu praca jest nowatorska i posiada dużą wartość w aspekcie klinicznym i praktycznym.

Na tej podstawie z pełnym przekonaniem i przyjemnością zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej ICZMP, o dopuszczenie pani mgr Kingi Sałacińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, ze względu na nowatorski i naukowy aspekt podjętych badań oraz dużą wartość poznawczą wnoszę o wyróżnienie pracy.

prof. UMK, dr hab. n. med. Magdalena Pasińska  
specjalista ginekolog-położnik,  
genetyk kliniczny  
2199804