



Białystok, 29 grudnia 2023

**Opinia na temat rozprawy na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
mgr Kingi Sałacińskiej**

z tytułuwanej

**Badanie podłoża genetycznego wrodzonej łamliwości kości z zastosowaniem metody
sekwencjonowania następnej generacji (NGS)**

Opinię niniejszą sporządziłem w związku z powołaniem mnie na recenzenta przez *Przewodniczącego Rady Naukowej* Instytutu 'Centrum Zdrowia Matki Polki' (ICZMP) w Łodzi – prof. Andrzeja Lewińskiego – w przewodzie doktorskim w/w Kandydatki.

Mgr Kinga Sałacińska ukończyła Uniwersytet Łódzki na kierunku Genetyka Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska, zaś obecnie jest pracownikiem Zakładu Genetyki ICZMP. Rozprawa została zrealizowana właśnie w Zakładzie Genetyki ICZMP pod merytorycznym kierunkiem profesora Instytutu dr hab. Agnieszki Gach.

Wybór tematu przez Doktorantkę jest bardzo ugruntowany, sensowny zarówno z punktu widzenia poznawczego, naukowo-badawczego, jak i praktycznego. Ta dysertacja stanowi ważny wkład w postępowanie badań nad rzadką, ciekawą i – wydawałoby się – bardzo niszową chorobą, czyli zespołem wrodzonej łamliwości kości (*Osteogenesis imperfecta*, OI). W rozumieniu epidemiologii OI jest klasyfikowana oczywiście jako choroba ultraradka, jednakże w rzeczywistości problem dotyka ogromnej liczby pacjentów i rodzin w całym świecie. Dlatego skupienie się na wszelkich aspektach tej choroby jest cenne, stanowi wyzwanie naukowe, a zarazem wnosi nowe koncepcje do diagnostyki i leczenia. Każda poparta dowodami naukowymi informacja ukierunkowana na wyjaśnienie podłoża i etiologii przyczynia się do optymalizacji postępowania z dziećmi z OI. Dodam, że zagadnienie jest wyjątkowo interdyscyplinarne, gdyż w kompleksową opiekę zaangażowane jest z reguły wiele specjalności (pediatria, neonatologia, ortopedia, medycyna regeneracyjna, rehabilitacja, terapia zajęciowa, psychologia kliniczna), natomiast solidny warsztat genetyczny i badania molekularne są szczególnie motorem postępu w tej dziedzinie. Od czasu pierwszej konwencjonalnej i uporządkowanej klasyfikacji OI, upowszechnionej przez Davida Silence'a (1978), dokonał się ogromny progres w diagnostyce tej choroby i innych rzadkich łamliwości szkieletowych. Przez 3 dekady doświadczaliśmy różnych zmian w podziałach i taksonomii OI (Fleure Van Dijk et al.), byliśmy świadkami ewolucji w nozologii, odkrywania nowych typów OI, a także różnych prób nowych leków i rewolucji w farmakoterapii OI (znakomite badania Francisa H Glorieux, Franka Raucha, Nicka Bishopa i wielu innych). Ale jednocześnie, mimo ogromnego postępu, w OI nadal niestety istnieje ogromny nierozwiązany dylemat dotyczący korelacji genotyp-fenotyp, co czyni tę chorobę nieprzewidywalną. Genetyka bowiem nie zawsze uzasadnia podjęcie terapii, a w decyzjach leczniczych nadal kierujemy się zazwyczaj kryteriami klinicznymi (np. ciężkością i liczbą złamań lub niepełnosprawnością, bilansem korzyści do działań niepożądanych etc.).

Niniejsza rozprawa dowodzi, że Autorka wnosi realny wkład w badania nad powiązaniem genotypu z fenotypem, doskonale radząc sobie z polemyczną dyskusją w tej dziedzinie. Stwierdzam, że Doktorantka podjęła się wyjątkowo ambitnego zadania, a wymiar praktyczny tych badań może być ważny i pożyteczny dla klinicystów.

Rozprawę doktorską stanowi zasadniczo spójny zestaw trzech anglojęzycznych publikacji w dobrych czasopiśmie, w których mgr K. Sałacińska jest pierwszym autorem, przy czym w każdej z nich w roli *senior author* pojawia się osoba promotora Agnieszki Gach. Podkreślam tu dobre ułożenie prac

Jh



i świadomy, właściwy dobór tych periodyków, gwarantujący dotarcie do stosownego czytelnika. Całość obejmuje dwie prace oryginalne i jeden artykuł z opisem przypadku. Na rozprawę składają się następujące publikacje: 1) Sałacińska K, Pinkier I, Rutkowska L (...) Gach A. *NGS analysis of collagen type I genes in Polish patients with Osteogenesis imperfecta: a nationwide multicenter study. Front Endocrinol* (Lausanne). 2023 2) Sałacińska K et al. *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 oraz 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. Łączny Impact Factor tego cyklu wynosi 11,972, przy czym ważne jest również, że kolejność ich zaprezentowania i omówienia wydaje się bardzo logiczna i ułatwia śledzenie wywodu i narracji rozprawy. Prace te są wprawdzie wieloautorskie, ale zaznaczam, że Doktorantka jest w każdej z nich nie tylko pierwszym autorem, ale również autorem korespondencyjnym, ponadto odpowiedzialnym za kluczowe aspekty badań (genetyka i warsztat molekularny), pełniąc w nich wiodącą rolę i nadając koncepcję pracy i – co nie mniej istotne – deklarując pozyskanie dofinansowania grantów na badania. A zatem udział merytoryczny Doktorantki – potwierdzony oryginalnymi oświadczeniami i deklaracjami ‘author contribution’ – jest znaczący i nie pozostawia wątpliwości. Ma to nie tylko znaczenie formalne, lecz odpowiada obecnym trendom, nowoczesnym standardom akademickim i ambitnym kryteriom ubiegania się o stopień naukowy. Takie podejście mnie nie dziwi, jako że praca pochodzi z renomowanego ośrodka tj. zespołu mającego doświadczenie w zakresie badań nad genetyką i kliniką rzadkich chorób, w szczególności genetycznie uwarunkowanych chorób szkieletowych.

Rozprawa ma układ logiczny, poprawny pod względem formalnym i jest kompletna (tzn. zawiera zwięzłe podsumowanie, streszczenia w obydwu językach, zgody komisji etycznych, aneks w postaci klarownych oświadczeń współautorów i wkładu w publikację), została na początku opatrzona spisem treści – niezbędnym przewodnikiem do tekstu głównego oraz wykazem skrótów, który w tym przypadku jest bardzo potrzebny ze względu na dość znaczny stopień skomplikowania. Rozdziały wstępne zostały zredagowane w sposób bardzo obszerny i skrupulatny, więc wymagają od czytelnika dużego skupienia, ale za to logicznie prezentują poszczególne elementy. Część wstępna tj. zawarte na 60 stronach fachowe omówienie teoretycznych podstaw OI, diagnostyki, genetyki, kliniki, leczenia tej choroby nie budzi zastrzeżeń, jest poparte 27 pozycjami adekwatnego piśmiennictwa, z kluczowymi dla tematu cytacjami. Pani mgr Kinga Sałacińska omawia tu w sposób ekspercki a zarazem syntetyczny: charakterystykę i opis kliniczny wrodzonej łamliwości kości, podłoże genetyczne, poszukiwanie korelacji genotypowo-fenotypowej w OI (co uważam za najważniejszy fragment uzasadniający podjęcie tematu) i wreszcie diagnostykę molekularną oraz leczenie. Jest to bardzo dobre dydaktyczne mini-kompendium nt. OI. Następnie, w dalszych częściach Doktorantka prezentuje szczegółowe komentarze do publikacji, ze stosownymi rozszerzeniami. Autorka wyznaczyła sobie zadanie analizy podłoża genetycznego OI w populacji polskiej, moim zdaniem najszerzej jak dotąd w literaturze dot. naszego kraju. W tym celu zaprojektowała oryginalne narzędzie badawcze do analizy kilkudziesięciu genów o udokumentowanej roli w patogenezie choroby, ale również genów-kandydatów potencjalnie związanych z OI. Cele pracy w liczbie 4 zostały sformułowane bardzo jasno: Określenie podłoża genetycznego w grupie polskich pacjentów z OI, poszukiwanie zmienności genetycznej w genach kolagenu typu I, ustalenie związku genotypu z obserwowanym fenotypem u osób z diagnozą molekularną choroby, a na koniec ocenę skuteczności metody NGS w diagnostyce OI.

W tym miejscu chciałbym podkreślić, iż nie ma żadnego powodu aby poddawać krytyce rozprawę doktorską, skoro jej sednem są wartościowe publikacje, które już przeszły pozytywnie przez szereg restrykcyjnych recenzji i opinii *editorial board* poszczególnych czasopism.



Na szczególną uwagę zasługuje część metodologiczna, która jest imponująca. W rozdz. „Materiał i metody” pani Kinga Sałacińska przedstawia szczegółowo sekwencję i protokół badań, który dowodzi jej ogromnej wiedzy i umiejętności w zakresie genetyki, a także samodzielności i talentu do warsztatu laboratoryjnego. Doktorantka omawia zatem poszczególne etapy i metody: izolację materiału, sekwencjonowanie następnej generacji (NGS), analizę bioinformatyczną, filtrowanie i klasyfikację wariantów i sekwencjonowanie Sangerowskie (albowiem obecność wariantów zidentyfikowanych metodą NGS weryfikowano metodą Sangera). W analizie ‘regionów letalnych’ Autorka wykorzystwała zasoby bazy OIVD. metody statystyczne przedstawione w pracy są perfekcyjne, co zresztą o wiele lepiej widać w wersji angielskiej w poszczególnych publikacjach.

Ogromnym walorem rozprawy jest szeroki zasięg badań, duża – zważywszy na małą częstość choroby – reprezentacja i uniwersalne przesłanie. Grupę badaną stanowiło aż 197 pacjentów (180 rodzin) z podejrzeniem OI. Za atut należy też uznać zdolność kooperacyjną Doktorantki i ośrodka / jednostki, w której jest afiliowana, gdyż w rekrutacji i dostarczeniu materiału genetycznego uczestniczyło w okresie 2016-2022 sześć ośrodków badawczych i klinicznych w kraju. Koordynacja takich badań, nawet w ramach grantu, jest niezwykle wymagająca i trudna logistycznie. Dlatego właśnie, zapewne dzięki determinacji i pracowitości Doktorantki i Promotora, mogło się udać największe pod względem liczebności i jakości badanie w naszym kraju. Gratulacje. Praca w *Front Endocrinol* 2023 opisująca charakterystykę fenotypową pacjentów z potwierdzoną NGS przyczyną choroby (warianty w genach kolagenu typu I) jest bardzo wartościowa, jako że zawiera wyniki pierwszego takiego badania nad podłożem genetycznym OI w Polsce. Jeszcze ważniejszą informacją z tej publikacji są nieraportowane wcześniej, nowe warianty zidentyfikowane wśród 97 różnych wariantów (z przewagą substytucji i delecji).

Bardzo doceniam publikację Kingi Sałacińskiej z zespołem w *Front Genet* 2021, gdzie przedstawiono 7 osób z patogennymi wariantami w „regionach letalnych” genów COL1A1. Te wyniki są faktycznie nowatorskie, nawiązując do wspomnianej przeze mnie wcześniej rozbieżności między genotypem a efektem fenotypowym. I przy uważnej lekturze tej pracy oryginalnej można wywnioskować, że odkrycie to może pomóc w zdefiniowaniu nowych czynników warunkujących najcięższe postaci kliniczne OI. I wreszcie praca kazuistyczna Sałacińska et al. *Mol Genet Genomic Med.* 2022 przedstawia pierwszą w literaturze fachowej substytucję glicyny na tryptofan w genie COL1A1, podczas gdy dotychczas opisano tylko 3 przypadki tej zamiany, ale dotyczące genu COL1A2. Ta publikacja Doktorantki przekonuje mnie o dociekliwości, rzetelności i pasji badawczej autorki i zespołu.

Z satysfakcją zauważam również inny cenny efekt tego projektu i badań pani Kingi Sałacińskiej: nieopisane dotychczas warianty wykryte u polskich pacjentów z OI zostały włączone do ogólnosiwiatowej bazy wariantów ClinVar, wzbogacając tym samym zasoby danych nt. patogenez OI. To w istocie oznacza realny i praktyczny wkład w naukę międzynarodową.

Rozdziały „Discussion” w anglojęzycznych pracach oryginalnych stanowiących oś rozprawy doktorskiej, są napisane zgrabnie, polemicznie i poprawnie zorganizowane, dowodząc dużej swobody Doktorantki w operowaniu językiem naukowym i literaturą przedmiotu. Wprawdzie lista autorów poszczególnych publikacji jest dość długa, ale przypomnę, że pani Kinga Sałacińska zadeklarowała w oświadczeniach swój przeważający udział w pisaniu i redagowaniu manuskryptów. Zatem pozwalam sobie przypisać te atuty właśnie Doktorantce i pierwszej autorce tych prac.

Rozprawę kończy 5 wniosków, komplementarnych do celów pracy i podsumowujących fakty i powiązania molekularne i patofizjologiczne w OI. Autorka sformułowała następujące wnioski: 1) Podłoże genetyczne OI wśród polskich pacjentów wykazuje znaczne podobieństwa do innych populacji europejskich w zakresie udziału genów kolagenowych w patogenezie choroby. 2) Mimo

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'JK' or similar initials, written in a cursive style.

wielu lat badań nad zmiennością genów kolagenu typu I, ponad 1/3 zidentyfikowanych w populacji polskiej zmian stanowiły nowe nieopisane wcześniej warianty, co wskazuje na niezwykle polimorficzność genów *COL1A1* i *COL1A2*. 3) Uzyskane wyniki potwierdzają, że wpływ wariantu na zmianę liczby lub struktury cząsteczek kolagenu typu I ma związek z nasileniem objawów klinicznych obserwowanych u pacjenta, ale utworzenie skutecznego modelu predykcyjnego, opartego o korelację genotypowo-fenotypową dla poszczególnych wariantów wymaga dalszych badań. 4) Wyniki nie potwierdzają teorii modelu regionalnego, a tylko część zidentyfikowanych wariantów wpisuje się w założenia modelu gradientowego, dlatego zaproponowane przed wielu laty modele warto poddać weryfikacji na podstawie wyników w innych populacjach. 5) Ze względu na dużą zmienność genetyczną i niewielką powtarzalność wariantów sprawczych między niespokrewnionymi rodzinami NGS jest najbardziej skutecznym narzędziem w diagnostyce wrodzonej łamliwości kości w populacji polskiej.

Wnioski powyższe zostały sformułowane jasnym, poprawnym językiem i są słuszne, postulując nieuchronną konieczność powszechnego stosowania metody NGS w diagnostyce OI. Poza tym doceniam dużą świadomość ograniczeń i krytyczne podejście do problemu, zwłaszcza we wniosku #3, gdzie Doktorantka akcentuje trudności w tworzeniu modelu predykcyjnego w OI, opartego o korelację genotypowo-fenotypową. Podzielam refleksję, że wymaga to dalszych badań. Zgodnie ze stwierdzeniem Autorki „nowoczesna, wysokoprzepustowa analiza genomowego DNA u pacjentów z klinicznymi objawami OI” daje nadzieję dla lepszego poznania choroby. To fakt, ale nie do końca jestem jednak przekonany, że analiza ta może wpłynąć na decyzję o farmakoterapii w codziennej praktyce.

Nie mam żadnych poważnych uwag krytycznych. Znalazłem zaledwie jedną nieścisłość w wykazie skrótów, mianowicie angielski skrót BMD oznaczający gęstość mineralną kości tłumaczy się jako „Bone Mineral Density”, nie zaś „Body Mineral Density”, jak to zostało napisane. Ale to zastrzeżenie nie ma zupełnie wpływu na całokształt pracy i formalny aspekt rozprawy.

W podsumowaniu stwierdzam z przekonaniem, że rozprawa doktorska pani mgr Kingi Sałacińskiej stanowi bardzo ambitne i bardzo dojrzałe opracowanie, wnoszące nowatorską informację o diagnostyce OI. Prezentowane tu wyniki badań staną się – jestem przekonany – przyczynkiem do dalszych poszukiwań i być może do praktyki klinicznej. Zarówno wyniki zawarte w publikacjach, jak i przesłanie całości tego cyklu zdecydowanie przyczyniają się do postępu w diagnostyce OI w Polsce, a dodatkowo odzwierciedlają umiędzynarodowienie polskiej nauki.

Rozprawa jest świetnie napisana, oceniam ją wysoko i pozytywnie. Całość opracowania, wliczając w to 3 publikacje w recenzowanych ważnych i indeksowanych periodykach, potwierdza kompetencje, wysoki walor naukowy, umiejętności, dojrzałość naukową i pasję badawczą Doktorantki. Przedstawiona mi do recenzji praca spełnia bezsprzecznie warunki prawnie określone w art. 187 Ustawy z dn. 20 lipca 2018 „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (Dz.U. z 2023 r. poz. 742, z późn. zmianami) definiujące kryteria i tryb postępowania w związku ze stopniami i tytułami naukowymi. Zwracam się zatem do Rady Naukowej ICZMP w Łodzi z wnioskiem o dopuszczenie Pani Kingi Sałacińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, ze względu na wysoką jakość publikacji i ich wysoki łączny IF przedkładam Radzie Naukowej wniosek o wyróżnienie pracy doktorskiej mgr Kingi Sałacińskiej.

Prof. dr hab. Jerzy Konstantynowicz

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

