

Zabrze dn. 10.05.2024

Dr hab. n. med. Tadeusz Osadnik

Katedra i Zakład Farmakologii

Wydział Lekarski w Zabrze

Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Leny Rutkowskiej pt.: „Analiza podłoża genetycznego wybranych dyslipidemii pierwotnych z zastosowaniem technologii sekwencjonowania następnej generacji”

Dyslipidemie pierwotne, które są uwarunkowane genetycznie, stanowią istotny problem kliniczny. Hipercholesterolemia rodzinna, jedna z pierwotnych dyslipidemii, z racji częstości występowania $\sim 1/250$ osób stanowi istotny problem także z perspektywy zdrowia publicznego. Pozostałe dyslipidemie, także uwarunkowane monogenowo, stanowią problem diagnostyczny dla lekarzy. Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska, która powstała w jednym z najlepszych ośrodków zajmujących się poradnictwem i diagnostyką genetyczną, dotyczy przede wszystkim diagnostyki molekularnej pacjentów z podejrzeniem pierwotnych dyslipidemii.

Doktorantka postawiła sobie następujące cele:

1. Analiza podłoża genetycznego hipercholesterolemii rodzinnej w populacji polskiej wśród pacjentów pediatrycznych.

2. Ocena przydatności metody sekwencjonowania następnej generacji (NGS) w diagnostyce dyslipidemii pierwotnych.
3. Ocena skuteczności narzędzia bioinformatycznego DECoN do identyfikacji zmian liczby kopii (CNV) z danych uzyskanych z badania NGS.
4. Charakterystyka porównawcza dwóch najczęstszych typów wrodzonej lipodystrofii częściowej (typu 2 i 3) z uwzględnieniem podłoża genetycznego oraz następstw metabolicznych. Poszukiwanie nowych wariantów patogennych w genach *LMNA* oraz *PPARG*.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska składa się z opisu zagadnienia oraz trzech tematycznie spójnych artykułów dotyczących dyslipidemii pierwotnych. W opisie przedmiotu rozprawy doktorskiej autorka opisuje dyslipidemie wyjaśniając różnice między pierwotnymi i wtórnymi dyslipidemiami. Doktorantka cytując badanie WOBASZ, zwraca uwagę na fakt, że dyslipidemia jest stwierdzana nawet u 70% dorosłej populacji w Polsce. Po krótkim opisie klasyfikacji dyslipidemii pierwotnych doktorantka szczegółowo opisuje jedną z najczęstszych chorób genetycznych – hipercholesterolemię rodzinną, podkreślając, że oprócz rozpoznania klinicznego konieczna jest diagnostyka genetyczna. Wstęp zaprezentowany w rozprawie doktorskiej stanowi idealne wprowadzenie w zagadnienia przedstawione w cyklu publikacji w skład którego wchodzi dwa artykuły dotyczące diagnostyki hipercholesterolemii rodzinnej oraz jeden dotyczący rodzinnej częściowej lipodystrofii. Zwraca również uwagę staranność edytorska. We wszystkich artykułach doktorantka była pierwszym i korespondencyjnym autorem. **Prezentowany cykl prac posiada łącznie 10.6 IF, oraz 270 punktów MNiSW.**

W skład cyklu włączono następujące publikacje:

1. **Rutkowska L**, Sałacińska K, Salachna D, Matusik P, Pinkier I, Kępczyński Ł, Piotrowicz M, Starostecka E, Lewiński A, Gach A. Identification of New Genetic Determinants in Pediatric Patients with Familial Hypercholesterolemia Using a Custom NGS Panel. *Genes (Basel)*. 2022 Jun 1;13(6):999. doi: 10.3390/genes13060999.
2. **Rutkowska L**, Pinkier I, Sałacińska K, Kępczyński Ł, Salachna D, Lewek J, Banach M, Matusik P, Starostecka E, Lewiński A, Płoski R, Stawiński P, Gach A. Identification of New Copy Number Variation and the Evaluation of a CNV Detection Tool for NGS Panel Data in Polish Familial Hypercholesterolemia Patients. *Genes (Basel)*. 2022 Aug 10;13(8):1424. doi: 10.3390/genes13081424. PMID: 36011335; PMCID: PMC9407502.
3. **Rutkowska L**, Salachna D, Lewandowski K, Lewiński A, Gach A. Familial Partial Lipodystrophy-Literature Review and Report of a Novel Variant in PPARG Expanding the Spectrum of Disease-Causing Alterations in FPLD3. *Diagnostics (Basel)*. 2022 Apr 30;12(5):1122. doi: 10.3390/diagnostics12051122. PMID: 35626278; PMCID: PMC9139680.

Pierwsza publikacja dotyczy poszukiwania molekularnego podłoża zaburzeń lipidowych w grupie 57 pacjentów pediatrycznych w wieku od 2 do 17 lat u których podejrzewano występowania rodzinnej hipercholesterolemii na podstawie kryteriów Simon-Broom. Na uwagę zasługuje autorski panel 21 genów poddanych analizie: *ABCA1, ABCG5, ABCG8, APOA5, APOB, APOC2, APOE, CYP7A1, GIPHBP1, LCAT, LDLR, LDLRAP1, LIPA, LMF1, LMNA, LPL, PCSK9, PRAG, SCAP, SREBF2, STAP1*. W grupie 48 pacjentów, aż u 33 stwierdzono wariant patogeny/prawdopodobnie patogeny w którymś z analizowanych genów. W grupie 9

pacjentów u których nie były spełnione kryteria Simon-Broom dla stężenia lipidów, tylko w 1 przypadku stwierdzono wariant patogeny. Warianty najczęściej były identyfikowane w genie *LDLR* oraz *APOB*. Co ciekawe, zidentyfikowano również dwa warianty w genie *LPL*, z których jeden – NM_000237.2:c953A>G – jest opisany w pracy jako patogeny, mimo że oceny *in-silico* w programach Polyphen i SIFT klasyfikują go jako łagodny (program Mutation Taster – „disease causing”). Także bazie ClinVar wariant jest raportowany jako łagodny/niepewnym znaczeniu (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/1550/>). Co ciekawe ten wariant został zidentyfikowany u pacjenta z patogenym wariantem w genie *LDLR*. Doktorantka, zauważa ten problem i opisuje go w swojej publikacji zwracając uwagę, że wariant ten był często stwierdzany u pacjentów z rodzinną złożoną hiperlipidemią. Ten przykład ilustruje trudności w interpretacji wyników NGS, co jednocześnie czyni również genetykę tak ciekawą. Jest to publikacja, która wnosi dużo do naszego zrozumienia genetycznego podłoża hipercholesterolemii rodzinnej u pacjentów pediatrycznych i może stanowić doskonałe uzasadnienie dla konieczności finansowania tych badań. Recenzent ze swojego doświadczenia wie, że rozpoznanie molekularnego podłoża często znosi opory zarówno u rodziców jak i lekarzy pediatrów odnośnie leczenia zaburzeń lipidowych w populacji pediatrycznej.

Celem drugiej publikacji była ocena częstości występowania zmian typu CNV (ang. copy number variants) w grupie pacjentów z FH. Jako metodę referencyjną słusznie wybrano MLPA. Pozyskane dane NGS przeanalizowano programem DECoN. W wyniku tak przeprowadzonej analizy w badanej populacji wśród pacjentów, u których zidentyfikowano SNV udało się autorom artykułu zidentyfikować dwóch nowych pacjentów z duplikacją eksonów 4-8 genu *LDLR*. Wyniki te potwierdzono metodą MLPA. Praca ta ma istotny wymiar praktyczny i nakazuje analizę pod kątem obecności CNV nawet w sytuacji identyfikacji wariantu patogenego w

jednym z genów związanych z FH. Wyniki tej pracy mogą przełożyć się na postępowanie u pacjentów z wysokimi wartościami LDL-C, które sugerują obecność dodatkowych wariantów w genach związanych z dyslipidemiami.

Trzecia publikacja to również niezwykle ciekawa praca podsumowująca wiedzę na temat lipodystrofii wrodzonych wraz z opisem przypadku 29 letniej pacjentki z wysokimi poziomami cholesterolu całkowitego i trójglicerydów oraz z wywiadem rodzinnym w kierunku cech lipodystrofii u matki, siostry matki. W badaniu genetycznym autorzy zidentyfikowali nowy wariant zmiany sensu w eksonie 4 genu *PPARG* (c.443G>A). W badaniu kaskadowym potwierdzono obecność ww. wariantu u syna (wysokie wartości trójglicerydów, obecnie w wieku 3 lat, bez cech lipodystrofii) oraz u matki pacjentki. W analizie bioinformatycznej stwierdzono potencjalny wpływ zidentyfikowanego wariantu na stabilność strukturalną białka. Wariant został zgłoszony do bazy ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/1098721/>).

Podsumowując uważam, że przedstawione mi do oceny badania mgr Leny Rutkowskiej, przedstawione w formie cyklu prac, spełniają wymogi stawiane rozprawom doktorskim i zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu „Centrum Zdrowia Matki Polki” z wnioskiem o dopuszczenie magister Leny Rutkowskiej do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Z uwagi na fakt, że badania Pani mgr Leny Rutkowskiej zostały opublikowane w renomowanych czasopismach, mają istotny wkład w zrozumienie podłoża molekularnego hipercholesterolemii rodzinnej oraz lipodystrofii, a także wymiar praktyczny dla

postępowania diagnostycznego w hipercholesterolemii rodzinnej, składam wniosek o
wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Tadeusz Osadnik.

Dr hab. n. med. Tadeusz Osadnik

Specjalista kardiologii

Specjalista genetyki klinicznej