

Dr hab. n.med Jolanta Wierzba
Zakład Pielęgniarstwa Ogólnego
Gdański Uniwersytet Medyczny
Gdańsk Dębinki 7 80-592
58-3492875
Email:kwierz@gumed.edu.pl

Gdańsk 15.08.2015

Ocena

rozprawy doktorskiej lek. Anny Błońskiej przygotowana na prośbę Dziekana Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu

Tytuł rozprawy: „**Genetyczne modyfikatory fenotypu kardiologicznego zespołu delecji 22q11**”

Ostatnie osiągnięcia genetyki pozwalają na wczesną swoistą diagnostykę schorzeń układu krążenia. Ma to szczególne znaczenie w przypadku wrodzonych wad serca i innych zaburzeń krążenia, ponieważ właściwa, celowana diagnostyka cytogenetyczna oraz analiza DNA pozwala na udzielenie wiarygodnej porady genetycznej, pozwala na prognozowanie przebiegu schorzenia a w przyszłości być może pozwoli na zastosowanie celowanego leczenia.

Wrodzone wady serca typu conotruncal dotyczące podziału stożka i pnia naczyniowego są główną cechą zespołu wad rozwojowych określanych od roku 1981 jako zespół mikrodelecji 22q11 (22q11DS, akronim CATCH 22). Jest to jedna z częściej występujących mikrodelecji w populacji (1/4000 urodzeń). Nazwą objęto opisywane wcześniej: zespół DiGeorge'a (DGS), zespół podniebieno-sercowo-twarzowy (VCFS, zespół Shprintzena) oraz zespół wad stożka i pnia naczyniowego, a także dysmorfii twarzy (CTAFS, zespół Takao). W wyniku utraty genów regionu 22q11, w szczególności zaś regionu 22q11.2, dochodzi do zaburzeń rozwojowych wielu narządów. Poza współistnieniem wrodzonych wad serca do wymienianych 180 cech zespołu należy m.in. brak lub dysfunkcja grasicy i gruczołów przytarczycznych, hipokalcemia w okresie noworodkowym, zaburzenia immunologiczne, dyskretne cechy dysmorfii twarzy, rozszczep podniebienia, skłonność do występowania po okresie dojrzewania zaburzeń psychicznych. Gen *Tbx1* znajdujący się w regionie 22q11.2 uważany jest za kluczowy w aspekcie występowania wad serca w 22q11DS. Podkreśla się, że rozpoznanie wady serca typu conotruncal, nawet bez wyraźnych cech dysmorfii i współtowarzyszenia zmian narządowych powinno

skłaniać do poszukiwania mikrodelecji w obszarze 22q11. Dość powszechna wiedza na ten temat sprawia, że zespół ten rozpoznawany jest coraz częściej. Równocześnie jednak obraz kliniczny 22q11DS jest niezmiernie zróżnicowany. Podobnie jak większość dysmorfologów w mojej praktyce spotkałam pacjentów u których stwierdzałam jedynie wady stożka tętniczego oraz takich u których klasycznym cechom dysmorfii i opóźnieniu psychomotorycznemu nie towarzyszyły wady układu krążenia. Ta zmienność fenotypowa nie jest bezpośrednio związana z rozmiarem delecji. Z tego powodu podjęcie przez Doktorantkę dalszych badań nad próbą wyjaśnienia istoty zróżnicowanego fenotypu kardiologicznego pacjentów z delecją 22q11 uważam ze wszech miar za uzasadnione. Zrozumienie istoty zmienności fenotypu zespołu delecji 22q11.2 ma znaczenie diagnostyczne, ale, jak ujęłam na początku, w przyszłości może także terapeutyczne.

Przedstawiona do oceny praca liczy 92 strony, podzielona jest na 11 rozdziałów, których struktura odpowiada ogólnie przyjętemu wzorcowi pisania prac naukowych o charakterze badawczym. Zawiera 7 tabel oraz 6 rycin. Piśmiennictwo obejmuje 102 pozycje, głównie anglojęzyczne, ułożone według kolejności cytowań, w większości pochodzące z ostatnich dziesięciu lat, odpowiadające podjętej tematyce.

We wstępie Doktorantka porządkuje nomenklaturę używaną przy nazywaniu zespołu jak również przedstawia w sposób szczegółowy jego fenotyp, zwracając szczególną uwagę na możliwe wady układu sercowo - naczyniowego. Następnie podejmuje próbę wyjaśnienia istoty zmian anatomicznych w oparciu o zasady embriogenezy. Za istotną uważam tę część wstępu która odnosi się do próby podsumowania wiedzy dotyczącej czynników genetycznych oraz pozagenetycznych modyfikujących niezwykle zróżnicowany fenotyp zespołu. Bowiem, jak słusznie doktorantka zauważyła, niewiarygodnej zmienności obrazu klinicznego u poszczególnych pacjentów jak dotąd nie tłumaczy ani zróżnicowana wielkość delecji, ani wzajemne oddziaływanie na siebie poszczególnych genów tego regionu.

W związku z tym Doktorantka postawiła sobie za cel próbę znalezienia genetycznych modyfikatorów ryzyka występowania wad serca w 22q11DS. Doktorantka słusznie wytypowała do badań nad modyfikacją gen *Tbx1*, dokonując resekwencjonowania drugiej (nie ulegającej delecji) kopii genu i poszukując w nim modyfikatorów genetycznych. Ponadto, celem poszukiwania modyfikatorów genetycznych w innych częściach genomu. Doktorantka przeprowadziła

genotypowanie za pomocą macierzy całogenomowych. Nadmienić należy, że Doktorantka na wstępie przeprowadziła także badania określające wielkość delecji celem uzyskania homogennej względem rozmiaru delecji grupy, co uważam ze wszęch miar za słuszne. Potwierdziła, że około 90% delecji obejmuje obszar 3MB.

Materiał obejmował bardzo liczną (438) grupę pacjentów. Warunek homogennej pod względem wielkości delecji (3 MB) spełniło 370 pacjentów. Tym samym dobór nadal licznej grupy pacjentów w znacznej mierze zdecydował o uzyskaniu wiarygodnych i oryginalnych wyników. Doktorantka dysponowała szczegółową, kliniczną analizą występowania wad układu sercowo-naczyniowego pacjentów w badanej grupie.

Do określenia wielkości mikrodelecji 22q11.2 wykorzystano metody genotypowania z użyciem markerów mikrosatelitarnych (STR) oraz metodę MLPA. Następnie w celu poszukiwania modyfikatorów genetycznych wykorzystano resekwencjonowanie genu *TBX1* i analizę powiązań otrzymanych polimorfizmów pojedynczych par nukleotydów z ich fenotypem kardiologicznym. Ostatnim etapem była analiza SNP całego genomu w oparciu badania asocjacyjne z wykorzystaniem macierzy Affymetrix Genome-Wide Human SNP 6.0, analizując pacjentów z najcięższymi wadami oraz tych u których wad serca nie wykryto.. Doktorantka omawia metodykę badań w sposób dokładny i zrozumiały, zilustrowany przejrzystymi rycinami. Świadczy to o bardzo dobrym opanowaniu przez Doktorantkę warsztatu badawczego wykorzystywanego w pracy. Przedstawiony opis metod jest w pełni satysfakcjonujący i adekwatny do wymagań stawianych rozprawie doktorskiej

Przeprowadzona analiza powiązania polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP) genu *TBX1* z różnymi obserwowanymi wadami serca wskazuje na brak istotności statystycznej, co sugeruje możliwość wysokiego stopnia heterogenności allelicznej tego genu. Nie znaleziono także powiązań między pospolitymi polimorfizmami w genie *TBX1* a złożonymi wadami serca.

W kolejnym etapie badania, do którego zakwalifikowanych pacjentów podzielono na dwie grupy: ze złożonymi wadami serca oraz bez wad serca. Znalezione istotne statystycznie powiązania dla SNP w obrębie genów: *VEGR*, *ANGP2*, *HAS2* i *MAGEB18*. Dalsze badania nad trzema pierwszymi wymienionymi genami wydają się szczególnie interesujące. Powyższa hipoteza, co podkreśla Doktorantka, musi być jednak zweryfikowana, ponieważ jak dotąd nie potwierdzono jej na większej liczbie

pacjentów. Doktorantka wskazuje także na znalezienie 15 SNP dla loci na chromosomie 13 w powiązaniu z tetralogią Fallota, fragment ten jednak, wg współczesnej wiedzy, nie zawiera obszarów regulatorowych.

Doktorantka analizowała dane dotyczącymi jedynie wad serca i słusznie zauważa, że kierunek dalszych badań korelacji genotypowo- fenotypowych powinien uwzględniać także inne współistniejące nieprawidłowości zespołu delecji 22q11.

Przeprowadzone w sposób jasny 19 stronicowa dyskusja jest przykładem analitycznego podsumowania przeprowadzonych badań. Doktorantka rzetelnie przedstawia tok myślenia na poszczególnych etapach swojej pracy badawczej i weryfikuje uzyskane wyniki badań w oparciu o nowoczesne piśmiennictwo.

Wnioski zamieszczone w podsumowaniu pracy są nad wyraz ostrożne (poza pierwszym, który potwierdza znane zjawisko najczęstszego występowania 3MB delecji). Świadczy to o krytycyzmie i rzetelności naukowej Doktorantki.

Moje uwagi związane z pracą dotyczą pewnych rozbieżności co do stosowania terminologii, jednak są to błędy nieliczne i nie są istotne dla oceny pracy.

Strona 14

- określenie upośledzenie umysłowe proponuję zastąpić używanym obecnie określeniem: Niepełnosprawność intelektualna

Strona 15

- pojęcie retrognathia – lepiej tłumaczy słowo cofnięcie żuchwy, niż wciągnięcie żuchwy
- mięsień depresor (*musculus depressor anguli oris*) proponuję zastąpić polskim określeniem mięsień obniżacz lub używać określenia łacińskiego
- pojęcie :prosty profil twarzy nie jest raczej używane w dysmorfologii

Strona 16

- skierowane w dół spoidła kości ust- proponuję zastąpić określeniem-skierowane ku dołowi kąćki warg, ten termin jest przyjęty w piśmiennictwie

Strona 23

- termin „laryngomalacja” oznacza raczej wiotkość krtani

Strona 25

Opóźnienie w nauce zastąpiłabym terminem :trudności w nauce

Strona 27

Określenie Obniżony poziom hormonu grasiczego

Strona 31

W zdaniu :u około 10%... postowie ;przyczyny proponuje użycie słowa wystąpienia

Strona 37 –Doktorantka proponuje wykonywane badania rezonansu magnetycznego w celem oceny obecności i rozmiarów grasicy. Myślę, że równie skutecznym (i bezpieczniejszym dla dziecka) sposobem badania jest ultrasonografia

W podsumowaniu chcę podkreślić, że rozprawa lek. Anny Błońskiej, stanowi istotny wkład do badań przyczyn zróżnicowanego fenotypu, w szczególności dotyczącego wad serca u pacjentów z delecją 22q11. Jest pracą oryginalną, ze znakomicie wyartykułowanymi hipotezami badawczymi i celem ,została zrealizowana w oparciu o nowoczesny warsztat badawczy. Doktorantka wykazała się dojrzałością interpretacji wyników badań. Należy podkreślić ,że osiągnięcie celów, które sobie postawiła, wymagało bardzo dużego nakładu pracy. Praca posiada wartości poznawcze i, mam nadzieję, jest zaczątkiem do kontynuacji prowadzonych badań przez Doktorantkę. Podkreślić również należy, że napisana jest jasnym ,zrozumiałym dla czytającego językiem, z zachowaniem prawidłowych zasad pisowni oraz interpunkcji.

Po zapoznaniu się z rozprawą doktorską lek. Anny Błońskiej stwierdzam, że praca pt. „**Genetyczne modyfikatory fenotypu kardiologicznego zespołu delecji 22q11**”spełnia wszelkie kryteria i wymogi ustawowe stawiane rozprawom na stopień doktora [rozprawa odpowiada warunkom określonym w art. 13 ust.1 z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym w zakresie (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z późn.zm.) i dlatego wnoszę do Rady Wydziału Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie lek. Anny Błońskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab.n.med Jolanta Wierzba

dr hab. n. med. Jolanta Wierzba
specjalista pediatrii
i genetyki klinicznej
8778860