

Prof.dr hab.n.med. Anna Latos-Bieleńska
Katedra i Zakład Genetyki Medycznej
Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu
Ul. Rokietnicka 8
60-806 Poznań

Recenzja

Rozprawy doktorskiej Pani lek.med. Marty Chrzanowskiej-Steglińskiej
pt. „Ocena występowania nosicielstwa wariantów w genie *DHCR7* odpowiedzialnych za wystąpienie zespołu Smitha, Lemlego i Opitza jak przyczyny poronień nawracających”

Promotor: Prof.dr hab.n.med. Piotr Sieroszewski

Promotor pomocniczy: Dr n.med. Hanna Moczulska

Przystępując do oceny rozprawy doktorskiej lek.med. Marty Chrzanowskiej-Steglińskiej, chciałabym wyrazić zadowolenie z powierzenia mi zaszczytnego obowiązku recenzenta - ze względu na renomę Kliniki kierowanej przez Prof.dr hab.n.med. Piotra Sieroszewskiego i Jego oraz Dr n.med. Hannę Moczulską wkład w przygotowanie znakomitych rekomendacji dotyczących diagnostyki genetycznej w ginekologii i położnictwie, a także ze względu na temat rozprawy doktorskiej, która dotyczy genetycznych przyczyn poronień samoistnych, a dokładnie jednego z najbardziej znanych zespołów genetycznych – zespołu Smitha, Lemlego i Opitza (SLOS).

Na przeprowadzenie badań lek.med. Marta Chrzanowska-Steglińska uzyskała zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi z dnia 16.06.2015 (nr RNN/150/15/KE).

Praca liczy 65 stron. Zawiera kolejno: wykaz skrótów, streszczenie w języku polskim, streszczenie w języku angielskim, Wstęp (10 stron), Cel pracy (1 strona), Materiał i metody (9 stron), Wyniki (16 stron), Dyskusja (7 stron) oraz Ograniczenia badania, Wnioski, Bibliografia, Spis tabel i rycin, Kwestionariusz ankietowy. Do pracy dołączono „Oświadczenie o wyrażeniu zgody na przeprowadzenie badania” oraz „Formularz świadomej zgody pacjentki na udział w badaniu genetycznym.” Praca ma układ typowy dla rozpraw doktorskich na stopień naukowy doktora nauk medycznych. Proporcje między poszczególnymi częściami pracy są właściwe.

Przystępując do oceny merytorycznej rozprawy doktorskiej, chcę podkreślić, że **szczególną zaletą pracy jest jej temat - podjęcie pionierskich badań nad związkiem nosicielstwa patogennych wariantów w genie *DHCR7* z poronieniami nawracającymi.**

Poronienia nawracające stanowią jeden ze znaczących problemów klinicznych w ginekologii, dotycząc 1-3% par starających się o potomstwo. Od początków diagnostyki genetycznej metodami cytogenetyki klasycznej doceniono badanie kariotypu u par z poronieniami samoistnymi (nosicielstwo translokacji wzajemnych i robertsonowskich oraz inwersji u któregoś z partnerów), jednak dominujące znaczenie czynnika genetycznego (aberracje chromosomowe, głównie liczby chromosomów u zarodka/płodu) wykazano dopiero wtedy, kiedy podjęto badania materiału z poronienia, zwłaszcza metodą porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy (aCGH). O ile aberracje chromosomowe i zmiany typu CNV u zarodka i płodu jako przyczyna poronień samoistnych są dobrze poznane, to na temat jednogenowych przyczyn poronień samoistnych trwa jeszcze gromadzenie wiedzy i wszystkie badania, które dotyczą tego zagadnienia, są bardzo doceniane.

Rozprawa doktorska lek.med. Marty Chrzanowskiej-Steglińskiej pt. „Ocena występowania nosicielstwa wariantów w genie *DHCR7* odpowiedzialnych za wystąpienie zespołu Smitha, Lemlego i

Opitza jak przyczyny poronień nawracających” bardzo dobrze wpisuje się w ten temat. Zespół Smitha, Lemlego i Opitza (SLOS) jest jednym z zespołów genetycznych, który przyciąga szczególną uwagę. Należy zaznaczyć, że badania naukowe nad tym zespołem prowadzone były od lat w Polsce przez zespół pod kierunkiem Prof. Małgorzaty Krajewskiej-Walasek, która zwróciła uwagę na niezgodność między częstością występowania nosicielstwa wariantów patogennych w genie *DHCR7* a częstością występowania SLOS, co zauważyli też inni autorzy. Wysunięto hipotezę, że SLOS u zarodka może prowadzić do wczesnych poronień, jednak nie podjęto badań w kierunku potwierdzenia tej hipotezy i dopiero badania lek.med. Marty Chrzanowskiej-Steglińskiej są pierwszą próbą weryfikacji tej hipotezy. Wybór tematu rozprawy doktorskiej uważam zatem za niezwykle trafny – wartościowy naukowo i ważny dla praktyki klinicznej.

We „Wstępie” Doktorantka podaje definicję poronienia i poronień nawracających, a następnie omawia czynniki epidemiologiczne, zwracając uwagę na wpływ wcześniejszych poronień, wieku matki, to, czy ciąży były z tym samym czy różnymi partnerami oraz wpływ czynników środowiskowych na ryzyko poronienia. Dalej Doktorantka opisuje etiologię poronień nawracających – przyczyny genetyczne, immunologiczne, anatomiczne, ogólnoustrojowe i endokrynologiczne oraz przyczyny psychologiczne. Opisuując przyczyny genetyczne, Doktorantka powinna wyraźniej podkreślić, że chodzi o nieprawidłowy genom zarodka/płodu. W tym miejscu oczekiwałabym szerszego rozwinięcia tematu, piśmiennictwo jest dość duże i interesujące, rozprawa doktorska dotyczy właśnie czynników genetycznych (choć nie aberracji chromosomowych). Warto byłoby poświęcić więcej miejsca chorobom monogenowym u zarodka/płodu, tymczasem ten krótki, trzydziestodniowy akapit, w ogóle nie ma odnośnika do piśmiennictwa. Ostatnia część „Wstępu” dotyczy zespołu Smitha, Lemlego i Opitza (SLOS). Informacje o tym zespole zajmują 2 strony, w tym Ryc. 1 przedstawiająca schemat syntezy cholesterolu i miejsce bloku metabolicznego. Wymienione są wady rozwojowe występujące w SLOS, a także informacje o prenatalnej manifestacji zespołu. Ta część „Wstępu” również pozostawia pewien niedosyt, SLOS jest bardzo charakterystycznym zespołem, chciałabym przeczytać we „Wstępie” o nim więcej, brakuje mi rycin, które pokazują charakterystyczne fenotyp, zwłaszcza ciężkiej postaci zespołu. Promotor pomocniczy – Dr n.med. Hanna Moczulska jest bardzo dobrym genetykiem klinicznym, znanym i cenionym w środowisku, znającym dobrze dysmorfologię, i moje oczekiwania z tego właśnie wynikają. Interesująca jest również diagnostyka prenatalna SLOS.

Celem pracy jest ocena częstości występowania wariantów p.Trp151Ter i p.Val326Leu genu *DHCR7*, będących przyczyną zespołu Smitha, Lemlego i Opitza u kobiet z co najmniej dwoma poronieniami w wywiadzie. Jak pisze Doktorantka, hipoteza badawcza jest taka, że u tych kobiet częstość występowania obu wariantów jest większa niż u pacjentek posiadających co najmniej dwoje zdrowych dzieci, bez poronień w wywiadzie. Cel pracy jest sformułowany ostrożnie i skromnie, a hipoteza badawcza - nie wymieniona w tym miejscu, ale wynikająca z pracy - jest taka, że nosicielstwo patogennych wariantów genu *DHCR7* jest jedną z przyczyn poronień nawracających.

Badania zostały przeprowadzone w latach 2015-2019 w Klinice Medycyny Płodu i Ginekologii I Katedry Ginekologii i Położnictwa UM w Łodzi, w Poradni Genetyki Klinicznej CSK UM w Łodzi i Zakładzie Genetyki Klinicznej Katedry Genetyki Klinicznej i Laboratoryjnej UM w Łodzi. Grupę badaną stanowiło 385 kobiet, które miały co najmniej 2 poronienia samoistne do 20 tygodnia ciąży. Grupę kontrolną stanowiło 99 kobiet, które nigdy nie roniły i które urodziły co najmniej dwoje zdrowych dzieci po 37. tygodniu ciąży. Obie grupy – badana i kontrolna zostały dobrze dobrane. Dla potrzeb badań Doktorantka przygotowała kwestionariusz ankietowy (załączony do pracy) dotyczący wywiadu rodzinnego (pytania o choroby genetyczne, nieprawidłowy rozwój dzieci, niepełnosprawność intelektualną, poronienia lub martwe urodzenia w rodzinie pacjentki i jej partnera), ekspozycji na szkodliwe czynniki środowiskowe w miejscu pracy i w domu, stan zdrowia, kontakt z chorobami zakaźnymi, nałogi, problemy z zajściem w ciążę, szczegółowy wywiad położniczy, badania genetyczne.

Doktorantka pisze, że „Informacja o prawidłowym kariotypie pacjentki i jej partnera pozwoliła wykluczyć z badania te pacjentki, u których istniało podejrzenie innej genetycznej przyczyny poronień”.

Jednak nie można mówić o wykluczeniu pacjentek z „innymi genetycznymi przyczynami poronień”, ponieważ najważniejszą nie tylko genetyczną przyczyną poronień samoistnych, ale najczęstszą przyczyną poronień w ogóle, jest aberracja liczby chromosomów u zarodka/płodu, nie związana z nieprawidłowym kariotypem rodzica, a tego w pracy nie badano.

Doktorantka badała dwa warianty w genie *DHCR7*. Warianty te zostały dobrze dobrane, stanowią one 65% wariantów patogennych w genie *DHCR7* w polskiej populacji. Analizę wariantu p.Val326Leu Doktorantka przeprowadziła metodą genotypowania z wykorzystaniem TaqMan SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, USA). Wariant p.Trp151Ter badała metodą genotypowania z zastosowaniem enzymu restrykcyjnego (PCR, następnie restryktaza *Bfal*). Obecność obu badanych wariantów potwierdzono sekwencjonowaniem metodą Sangera. Są to proste, ale wiarygodne i całkowicie wystarczające metody badań genetycznych.

„Wyniki” zajmują 16 stron, ale 2 tabele (Tabela 24 i 25) należą do „Dyskusji”, a 4 strony opis metod statystycznych zastosowanych w pracy, co widziałabym w „Materiałach i Metodach”. W „Wynikach” dużo miejsca Doktorantka poświęca charakterystyce grupy badanej i kontrolnej. Pacjentki w obu grupach były w takim samym wieku, w każdej z grup połowa pacjentek miała 36 lub mniej lat. Był to wiek pacjentek w chwili badania, ale interesujące byłoby również porównanie wieku pacjentek w chwili, gdy urodziły (grupa badana) lub rodziły zdrowe dzieci (grupa kontrolna). Czy Doktorantka ma takie dane?

Porównanie chorób i czynników ryzyka w obu grupach wykazała, że w grupie badanej częściej występowała choroba Hashimoto i różnica ta była istotna statystycznie. Co do palenia papierosów, to odsetek ten wydaje się znacznie zaniżony w obu grupach, przy czym odsetek kobiet palących papierosy był większy w grupie kontrolnej. Z Polskiego Rejestru Wrodzonych Wad Rozwojowych wiemy, jak trudno jest uzyskać wiarygodne informacje na ten temat, badania Doktorantki to potwierdzają.

W grupie badanej kobiety miały od 2 do 9 ciąż, w tym 2 do 7 poronień samoistnych (69,1% miało 2 poronienia, 23,1% 3 poronienia). Interesującym wynikiem jest to, że kolejne poronienia były z reguły coraz wcześniej. Czy Doktorantka może zaproponować jakieś wytłumaczenie tego faktu?

Badanie wariantów genu *DHCR7* wykazało, że ani w grupie badanej ani kontrolnej nie występował wariant p.Val326Leu. Wariant p.Trp151Ter wykryto u 5,8% pacjentek w grupie badanej (22 pacjentki) oraz u 4,0% pacjentek w grupie kontrolnej (4 pacjentki). Chociaż różnica ta nie była istotna statystycznie, to wynik ten uważam za bardzo interesujący, zachęcający do dalszych badań.

„Dyskusja” licząca 7 stron (ale należą do niej jeszcze 2 Tabele umieszczone błędnie w „Wynikach”) jest dobrze napisana i świadczy o bardzo dobrej znajomości piśmiennictwa i umiejętności interpretacji wyników badań. „Dyskusja” jeszcze lepiej niż „Wstęp” wyjaśnia, dlaczego Doktorantka podjęła temat nosicielstwa wariantów patogennych w genie *DHCR7* u kobiet z poronieniami samoistnymi. Szczególne wrażenie robi niezwykle opis przypadku wskazujący na związek nosicielstwa patogennych wariantów w genie *DHCR7* z poronieniami nawracającymi oraz dane z piśmiennictwa dotyczące prenatalnego przebiegu SLOS. Doktorantka wskazuje na różnice w występowaniu poszczególnych wariantów patogennych w różnych populacjach oraz na różnice fenotypowe tylko częściowo zależne od rodzaju wariantu patogennego. Przy niektórych wariantach patogennych fenotyp może nie być charakterystyczny i SLOS może pozostać nierozpoznany. Interesująca jest hipoteza, że nosicielstwo wariantu patogennego u matki może wpłynąć na rozwijający się zarodek/płód, zwłaszcza jeśli jest on dotknięty SLOS a nawet jeśli jest tylko nosicielem wariantu patogennego. Doktorantka przytacza też prace wskazujące, że na fenotyp SLOS ma dodatkowy wpływ nosicielstwo wariantów jeszcze innych genów u matki.

Doktorantka podaje ograniczenia badania. W tym miejscu dodać należy jeszcze jeden punkt – brak wiedzy o kariotypie poronionego samoistnie zarodka/płodu.

Doktorantka umieściła dwa wnioski, z których pierwszy mówiący, że „nosicielstwo wariantów p.Val326Leu i p.Trp151Ter genu *DHCR7* wydaje się nie być czynnikiem ryzyka poronień nawracających wśród kobiet z populacji polskiej” jest przedwczesny. Przeciwnie, wydaje się, że z pracy wynikają przesłanki wskazujące na to, że warianty patogenne genu *DHCR7* mogą być związane przyczynowo z poronieniami samoistnymi. Gorąco zachęcam Doktorantkę do kontynuacji tak pięknie podjętych badań. Gdyby zmienić grupę badaną poprzez zbadanie materiału genetycznego poronionego zarodka/płodu pod kątem występowania aberracji chromosomowych (występujących w ok. 50% poronień samoistnych) i wykluczenia tych pacjentek z grupy badanej, to może się okazać, że różnica między częstością nosicielstwa badanych najczęstszych wariantów między grupą badaną i grupą kontrolną byłaby istotna statystycznie. Oczywiście ważne byłoby następnie zbadanie patogennych wariantów genu *DHCR7* także u poronionego zarodka/płodu. Badania takie można zrobić na materiale z poronienia zabezpieczonym w postaci kostek parafinowych, dla części pacjentek materiał taki byłby dostępny.

Piśmiennictwo, dobrze dobrane, liczy 92 pozycje, są to zarówno prace klasyczne, jak i najnowsze.

Praca została opublikowana w Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol (IF=2,831), zatem oceniona i doceniona przez wymagających recenzentów międzynarodowych:

Marta Chrzanowska-Steglińska, Hanna Moczulska, Beata Skoczyła, Michał Pietrusiński, Karolina Antosik, Paulina Jakiel, Marta Kacprzak, Maciej Borowiec, Piotr Sieroszewski

Occurrence of c.976 G>T (p.Val326Leu) and c.452 G>A (p.Trp151Ter) variants in *DHCR7* gene in population of polish women with recurrent miscarriage

Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2020;252:252-255. doi: 10.1016/j.ejogrb.2020.05.063. Epub 2020 Jun 20. IF (2021) = 2,831.

Reasumując stwierdzam, że praca dotyczy oryginalnego zagadnienia, po raz pierwszy na świecie w badaniach na dużej grupie pacjentek z poronieniami nawracającymi podejmuje badania nad związkiem między nosicielstwem przez kobietę wariantów patogennych w genie *DHCR7* i poronieniami nawracającymi, wyniki są wartościowe i wskazują na to, że jest to właściwy kierunek dalszych badań, wyniki zostały opublikowane w recenzowanym czasopiśmie międzynarodowym z Listy Filadelfijskiej. Praca spełnia wszelkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim na stopień naukowy doktora nauk medycznych. Zwracam się zatem do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie lek.med. Marty Chrzanowskiej-Steglińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof.dr hab.n.med. Anna Latos-Bieleńska

Poznań, dnia 14.02.2023