

dr hab. n.med., prof. IPIN Agnieszka Ługowska  
Zakład Genetyki  
Instytut Psychiatrii i Neurologii  
Al. Sobieskiego 9  
02-957 Warszawa,  
E-mail:alugipin@yahoo.com

Warszawa, 10 czerwca 2021r.

Instytut Psychiatrii i Neurologii  
Zakład Genetyki  
02-957 Warszawa, ul. Sobieskiego 9  
Tel. 22 45 82 610; 22 45 82 856  
fax. 22 858 91 69.REGON 000288509

**Recenzja**  
**rozprawy doktorskiej na stopień naukowy doktora nauk medycznych**  
**w dziedzinie nauki medyczne i nauki o zdrowiu, w dyscyplinie nauki medyczne**  
**Pani magister Anny Bogdańskiej**  
**na temat**  
**„Ocena hipoglikozylacji transferyny**  
**metodą elektroogniskowania jako biomarkera**  
**w diagnostyce pierwotnych i wtórnych zaburzeń glikozylacji białek”.**  
**Promotor: Prof. dr hab. n. med. Anna Tylki-Szymańska**

**Ocena formalna**

Rozprawę doktorską Pani mgr Anny Bogdańskiej tworzy cykl artykułów spójnych tematycznie, gdyż dotyczą one badań związanych z zastosowaniem oceny hipoglikozylacji transferyny w rozpoznawaniu zaburzeń glikozylacji białek, zarówno o charakterze pierwotnym, jak i wtórnym. Na rozprawę składają się artykuły opublikowane w czasopismach o zasięgu międzynarodowym (4 prace) lub krajowym (1 praca). Stwierdzam, więc, że przedstawiona mi do oceny rozprawa spełnia wymogi określone w Art. 187 Ustawy z dnia 20.07.2018r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018r. poz. 1668 ze zm.).

Dołączone do rozprawy doktorskiej oświadczenia współautorów są poprawnie sformułowane i pozwalają ocenić wkład Doktorantki oraz innych autorów w powstanie powyższych artykułów; konkretnie: wkład pracy Doktorantki wynosił po 80% w przypadku 2 artykułów, po 40% w przypadku kolejnych 2 oraz 45% w przypadku 1 pracy.

Stwierdzam, że dostarczona rozprawa doktorska spełnia wymogi formalne.

**Recenzja rozprawy doktorskiej**

Rozprawę doktorską Pani mgr Anny Bogdańskiej pod tytułem „Ocena hipoglikozylacji transferyny metodą elektroogniskowania jako biomarkera w diagnostyce pierwotnych i wtórnych zaburzeń glikozylacji białek” stanowi zbiór



pięciu publikacji. Cztery z nich to artykuły oryginalne, a jeden – to praca przeglądowa. Przedstawione prace są tematycznie spójne, a ich treść jest adekwatna do tytułu rozprawy. Artykuły oryginalne składające się na rozprawę doktorską ukazały się w czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym: *Orphanet Journal of Rare Diseases*, *Frontiers in Pediatrics*, *Molecular Genetics and Metabolism Reports*, *Acta Biochimica Polonica* oraz uznanym czasopiśmie krajowym – *Postępy Biochemii*. Doktorantka jest pierwszą autorką czterech prac, a w jednej jest drugim autorem, ale z równocennym udziałem, jak pierwszy autor na podstawie oświadczeń współautorów. Doktorantka nie była autorką korespondującą w żadnej pracy. Wszystkie czasopisma o zasięgu międzynarodowym mają przypisany wskaźnik cytowań czyli impact factor (IF; łącznie 9,599).

Recenzowana rozprawa doktorska składa się z wstępu, celów rozprawy, streszczeń w języku polskim i angielskim, słów kluczowych, wykazu publikacji, omówienia, wniosków, załączonych publikacji, będących przedmiotem rozprawy oraz spisu tabel i rycin. Ponadto, dołączone są: oświadczenia współautorów, zgoda Komisji Bioetycznej i piśmiennictwo. Układ rozprawy oceniam jako prawidłowy.

Doktorantka postawiła sobie następujące cele badawcze:

- **Cel główny:** ocena glikozylacji transferyny badanej metodą elektroogniskowania w typie I i II CDG oraz we wtórnych zaburzeniach glikozylacji u polskich pacjentów diagnozowanych w Instytucie „Pomnik-Centrum zdrowia Dziecka” (IP-CZD) w latach 1995-2020.

- **Cele szczegółowe:**

1) Analiza retrospektywna i opis zaburzeń glikozylacji transferyny oraz klinicznych, biochemicznych i molekularnych cech u 32 pacjentów z wrodzonymi zaburzeniami glikozylacji (CDG) zdiagnozowanych w IP-CZD w latach 1995-2020. Przedstawienie wyników wieloletniej obserwacji klinicznej pacjentów w odniesieniu do wyników badań biochemicznych i molekularnych.

2) Ocena zaburzeń glikozylacji transferyny nie związanych z wrodzonymi zaburzeniami glikozylacji (CDG), czyli tzw. wtórne zaburzenia glikozylacji. Przedstawienie nieprawidłowości ogniskowania izoform transferyny u pacjentów z zaburzeniami funkcji wątroby.

3) Oszacowanie częstości występowania, zapadalności i charakterystyka genotypów we wrodzonych zaburzeniach glikozylacji w Polsce.

4) Wykazanie przydatności metody elektroogniskowania (IEF) transferyny w materiale z suchej kropli krwi na bibule w diagnostyce wrodzonych zaburzeń glikozylacji.

5) Przedstawienie przydatności elektroogniskowania (IEF) transferyny jako metody diagnostycznej oraz patomechanizmu i diagnostyki wrodzonych zaburzeń glikozylacji, a także podsumowujący opis wszystkich znanych podtypów CDG.



**Główny cel** podjętych przez doktorantkę badań jest sformułowany jasno, chociaż w przeważającej mierze jest powtórzeniem tematu rozprawy.

**Cele szczegółowe** są bardzo rozbudowane, ale pozostają jednak przejrzyste.

W ramach badań mgr Bogdańska przeanalizowała hipoglikozylację transferyny u polskich pacjentów kierowanych do IP-CZD w latach 1995-2020 z podejrzeniem wrodzonych zaburzeń glikozylacji.

W artykule nr 1, opublikowanym w *Orphanet Journal of Rare Diseases*, grupę badaną stanowiło 32 pacjentów z rozpoznaniem zaburzeniem N-glikozylacji lub złożonymi zaburzeniami N- i O-glikozylacji. W artykule nr 2, opublikowanym w *Frontiers in Pediatrics*, do badania zakwalifikowano 19 pacjentów z pierwotną chorobą wątroby, u których rozwinęły się wtórne zaburzenia glikozylacji. Wśród tych pacjentów u 12 osób stwierdzono ostre uszkodzenie wątroby (acute liver injury, ALI) lub ostrą niewydolność wątroby (acute liver failure, ALF), u 5 osób – przewlekłą chorobę wątroby (chronic liver disease, CLD) oraz u 2 osób – nawracającą ostrą niewydolność wątroby (recurrent ALF, RALF). W artykule nr 3, opublikowanym w *Molecular Genetics and Metabolism Reports*, grupa badana składała się z 50 pacjentów z rozpoznaniem zaburzeniem CDG. Natomiast w artykule nr 4, opublikowanym w *Acta Biochimica Polonica*, materiał do badań pochodził od 48 osób – 12 pacjentów z CDG oraz 36 osób kontrolnych.

W omawianych artykułach izoformy transferyny identyfikowano za pomocą metody izoelektroogniskowania na żelu agarozowym z następującą immunofiksacją, barwieniem w roztworze kumazyny (Coomasie Brilliant Blue) i oceną procentowego udziału izoform na podstawie wyników pomiarów densytometrycznych na aparacie Beckman.

Ponadto, dokonano analizy danych zawartych w dokumentacji pacjentów (w tzw. kartach pacjentów) pod kątem:

- 1) izoform O-glikoprotein apolipoproteiny C-III (ApoC-III) oznaczanych metodą IEF
- 2) aktywności fosfomannomutazy 2 (PMM2; EC 5.4.2.8) i izomerazy mannozofosforanowej (MPI; EC 5.3.1.8) w fibroblastach
- 3) aktywności fosfoglukomutazy 1 (oznaczanej metodą spektrofotometryczną)
- 4) profilu oligosacharydu związanego z nośnikiem lipidowym (LLO) w fibroblastach; metoda HPLC
- 5) objawów klinicznych i podstawowych badań z zakresu biochemii klinicznej takich jak: AST, ALT, INR
- 6) wyników badań z zakresu genetyki molekularnej (sekwencjonowanie poszczególnych genów oraz WES)

Otrzymane wyniki poddano również wnikliwej analizie statystycznej z wykorzystaniem programu R.



Ogólnie należy stwierdzić, że doktorantka zastosowała **metody badawcze** adekwatne do prowadzonych obserwacji oraz możliwe do przeprowadzenia w dostępnych dla niej warunkach.

Doktorantka podjęła bardzo interesujący temat zastosowania metody izoelektroogniskowania izoform transferyny w diagnostyce pierwotnych i wtórnych wrodzonych zaburzeń glikozylacji – CDG (z ang. congenital disorders of glycosylation). CDG są genetycznie uwarunkowanymi chorobami metabolicznymi, w których dochodzi do zaburzenia procesów glikozylacji białek lub lipidów. Hipoglikozylacja białek może być efektem nieprawidłowej N-, O- lub złożonej N- i O- glikozylacji, czyli wieloetapowej, potranslacyjnej obróbki białek, w uproszczeniu polegającej na syntezie łańcucha oligosacharydowego, jego przyłączeniu do łańcucha aminokwasowego, a następnie złożonej modyfikacji pierwotnego glikanu. Wszystkie obecnie znane typy CDG zostały dokładnie omówione w artykule nr 5, opublikowanym w *Postęпах Biochemii*.

W laboratoryjnej diagnostyce CDG wykorzystuje się zaburzoną N-glikozylację transferyny. Jest to badanie izoform transferyny np. przy użyciu metody elektroogniskowania. Transferyna jest glikoproteiną, w której do łańcucha aminokwasowego dołączone są wiązaniem N-glikozydowym dwa glikany. W zależności od budowy glikanów wyróżnia się różne frakcje izoform transferyny. U osób zdrowych występuje pięć frakcji izoform z przewagą tetrasjalotransferyny. U pacjentów z CDG typu I wzrasta procentowy udział disjalotransferyny i asjalotransferyny. W CDG typu II obserwuje się wzrost frakcji asjalo-, monosjalo-, disjalo- i trisjalotransferyny. W typie I/II CDG wzrasta procentowy udział asjalo-, monosjalo- i disjalotransferyny. W każdym z typów obniża się procentowy udział tetrasjalotransferyny.

Jak wskazują wyniki otrzymane w artykułach nr 1 i 4 (publikacje w *Orphanet Journal of Rare Diseases* oraz w *Acta Biochimica Polonica*) elektroogniskowanie izoform transferyny (Tf) pozwala na różnicowanie osób z zaburzeniami glikozylacji białek różnych typów od osób zdrowych. Analiza statystyczna wykazała silną ujemną liniową korelację między asjalo- i tetrasjalo-Tf oraz między disjalo- i tetrasjalo-Tf. Wykazano również silną dodatnią liniową korelację między pentasjalo- i tetrasjalo-Tf. Nie można natomiast odróżnić pacjentów z PMM2-CDG od pacjentów z non-PMM2-CDG na podstawie profilu izoform Tf, mimo że pod względem objawów klinicznych różnice są wyraźne. Zastosowana metoda elektroogniskowania pozwoliła również na śledzenie efektów leczenia mannozą u 2 pacjentów z MPI-CDG i spostrzeżenie, że obraz i procentowy udział izoform Tf zmieniał się i ulegał normalizacji.

Oprócz w/w pierwotnych zaburzeń CDG, izoformy transferyny pozwalają na wykrywanie pacjentów z wtórnymi zaburzeniami glikozylacji, co przedstawiono



w artykule nr 2 (publikacja w *Frontiers in Pediatrics*). U wszystkich dzieci z pierwotną chorobą wątroby (ALI/ALF, CLD, RALF) wykazano podwyższony poziom asjalo- i monosjalotransferyny, a u dzieci z RALF w profilu hipoglikozylacji transferyny dominowała asjalotransferyna podczas epizodów ALF. Artykuł nr 2, przedstawiający wyniki analizy izoform transferyny u pacjentów z pierwotną chorobą wątroby jest pierwszym tego typu doniesieniem na świecie.

Mimo, że metoda elektroogniskowania izoform transferyny w surowicy jest uznawana za tzw. „złoty” standard, to jednak należy liczyć się z wynikami wyjątkowymi, nietypowymi, o których pisze Doktorantka w artykule nr 1, a konkretnie zauważono, że u 2 pacjentek z ALG13 (grupa pacjentów z non-PMM2-CDG-I, deficyt transferazy UDP-GlcNAc) otrzymano wynik tylko nieznacznie odbiegający od obrazu prawidłowego (niewielki procentowy wzrost asjalo- i disjalo Tf lub tylko disjalo Tf). U 1 pacjentki z łagodną postacią ALG1 (grupa pacjentów z non-PMM2-CDG-I, deficyt beta-1,4-mannozylotransferazy) – wynik był prawidłowy. Oba zjawiska nie były dotychczas raportowane w literaturze. Takie nietypowe wyniki skłaniają do zachowania szczególnej czujności diagnostycznej i podejmowania dodatkowych analiz weryfikujących.

Uważam, że niezwykle wartościowym osiągnięciem mgr Bogdańskiej jest adaptacja metody elektroogniskowania izoform transferyny z wykorzystaniem suchej kropli krwi na bibule (ang. dried blood spot; DBS) w diagnostyce CDG. Wyniki przedstawione w artykule nr 4 (publikacja w *Acta Biochimica Polonica*) wskazują, że DBS można z powodzeniem traktować jako źródło materiału do badań. Ma to niewątpliwe **znaczenie praktyczne**, zwłaszcza w przypadku pacjentów pediatrycznych, rozwiązuje również aspekty logistyczne.

Chociaż w przypadku łagodnej postaci PMM2-CDG badanie w DBS musi być potwierdzone i rozszerzone innymi analizami, to jednak można mieć nadzieję, że zastosowanie DBS pozwoli na szeroko zakrojony skryning selektywny w kierunku CDG. To z kolei mogłoby przyczynić się do podniesienia poziomu rozpoznawalności chorób uwarunkowanych zaburzeniami glikozylacji.

Wrodzone zaburzenia glikozylacji zalicza się do grupy chorób ultra-rzadkich przy założeniu, że choroba jest uznawana za rzadką, jeśli dotyka mniej niż 1: 2 000 osób (czyli mniej niż 50: 100 000 osób). Dane otrzymane w pracy nr 3 (publikacja w *Molecular Genetics and Metabolism Reports*) wskazują, że w Polsce częstość występowania CDG jako grupy chorób szacuje się na 1: 1 000 000, przy czym najczęstsza z nich, PMM2-CDG – na 0,4: 1 000 000. Poziom zapadalności na CDG w 2020r. w Polsce wyniósł 0,013: 100 000 mieszkańców.

Do najczęściej spotykanych mutacji patogennych w genie *PMM2* u pacjentów polskich należą mutacje p.Arg141His (25% zmutowanych alleli) oraz p.Val231Met (21% zmutowanych alleli).



Stwierdzono, że oprócz PMM2-CDG częstymi typami były SRD5A3-CDG oraz ALG13-CDG. Ciekawą obserwacją jest fakt, że w grupie polskiej nie wykryto typu ALG6-CDG, który uważany jest za drugi najczęściej identyfikowany typ CDG na świecie.

Warto zaznaczyć, że znajomość genetycznego podłoża danej choroby CDG u probanda i jego rodzinny stanowi ważną informację w poradnictwie genetycznym, jak również pozwala na prognozowanie przebiegu choroby na podstawie zależności genotyp-fenotyp. Wiedza ta może być pomocna w momencie pojawienia się możliwości terapeutycznych dla konkretnego zaburzenia CDG.

**Wyniki** otrzymane w ramach poszczególnych artykułów, tworzących rozprawę **zostały omówione przez doktorantkę w sposób jasny** i tam też zostały one porównane z dotychczasowymi danymi dostępnymi w literaturze światowej w częściach poświęconych dyskusji. Natomiast w samej rozprawie doktorskiej brakuje jednak pełniejszego przedyskutowania wyników – brakuje „rozprawiania” o wynikach.

Z obowiązku recenzenta podaję również uwagi, które nasunęły mi się podczas czytania tej pracy:

- 1) Kolejność wniosków nie odpowiada kolejności celów. Ponadto, są to raczej stwierdzenia – raporty z wyników, a nie wnioski. Jak wspomniałam wcześniej cele są przedstawione bardzo szczegółowo, natomiast wnioski – lakonicznie. Brakuje również ogólnego podsumowania (wniosku ?) odnoszącego się do tytułu rozprawy i odpowiadającego na pytanie, czy wzór hipoglikozylacji transferyny oceniany metodą elektroogniskowania można uznać za biomarker przydatny w diagnostyce pierwotnych i wtórnych zaburzeń glikozylacji białek.
- 2) W recenzowanej pracy zauważyłam błędy literowe i interpunkcyjne, których listę mogę udostępnić doktorantce lub promotorowi.

Muszę jednak podkreślić, że są to uwagi, które nie mogą wpłynąć na obniżenie merytorycznej wartości recenzowanej pracy.

W ostatniej części rozprawy doktorantka podaje **spis piśmiennictwa**, z którego korzystała podczas pisania artykułów tworzących rozprawę doktorską. Lista zawiera 122 pozycje. Cytowane prace są dobrane adekwatnie do omawianych zagadnień.

W podsumowaniu pragnę stwierdzić, że artykuły tworzące rozprawę doktorską mgr Bogdańskiej prezentują wysoki poziom merytoryczny i **stanowią oryginalne rozwiązanie problemu naukowego**, jakim jest pytanie, czy ocena hipoglikozylacji transferyny metodą elektroogniskowania jest dobrym biomarkerem w rozpoznawaniu pierwotnych i wtórnych zaburzeń CDG. Kandydatka dała dowód swojej głębokiej **wiedzy zarówno teoretycznej, jak i praktycznej** (laboratoryjnej). Omawiane

artykuły oraz wkład autorki w ich powstanie świadczą, że posiada ona **umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej**. Recenzowana praca stanowi samodzielny i oryginalny dorobek autorki.

### **Wniosek końcowy**

Przedstawioną mi do recenzji rozprawę doktorską Pani mgr Anny Bogdańskiej oceniam **pozytywnie** i uważam, że spełnia ona warunki określone w Art. 187 Ustawy z dnia 20.07.2018r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018r. poz. 1668 ze zm.) i uzasadnia nadanie Kandydatce stopnia doktora nauk medycznych w dziedzinie nauki medyczne i nauki o zdrowiu, w dyscyplinie nauki medyczne. Zwracam się zatem z wnioskiem do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka” o dopuszczenie Pani mgr Anny Bogdańskiej do kolejnych etapów przewodu doktorskiego.

*Agnieszka Ługowska*

06095 dr hab. n. med. Agnieszka Ługowska  
Prof. nadzw. w IPiN  
DIAGNOSTA LABORATORYJNY  
analityk kliniczny,  
specjalista laboratoryjnej  
genetyki medycznej