Prof. dr hab. n. med. Mirosław Bik-Multanowski
Kierownik Zakładu Genetyki Medycznej
Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum
Ul. Wielicka 265, 30-663 Kraków

Kraków, 10.07.2021

Recenzja pracy doktorskiej
mgr Anny Bogdańskiej
„Ocena hipoglikozylacji transferyny metodą elektroogniskowania jako biomarkera w diagnostyce pierwotnych i wtórnych zaburzeń glikozylacji białek"

Wrodzone zaburzenia glikozylacji to szybko rosnąca grupa bardzo rzadkich, wrodzonych błędów metabolizmu, stwarzających spore problemy diagnostyczne i słabo poddających się leczeniu. Zaburzenia te wynikają z wrodzonego deficytu aktywności enzymów biorących udział w procesach glikozylacji białek i innych makrocząsteczek. Wrodzone zaburzenia glikozylacji są bardzo różnorodne fenotypowo i w zasadzie mogą upośledzać funkcję każdego narządu, co jest główną przyczyną trudności diagnostycznych. W konsekwencji badania dotyczące patogenezy, diagnostyki i leczenia tych chorób są ważne z punktu widzenia poznawczego i klinicznego, zwłaszcza w dobie medycyny personalizowanej.

Przekazana mi do recenzji rozprawa na stopień doktora nauk medycznych została zrealizowana w Zakładzie Biochemii, Radioimmunologii i Medycyny Doświadczalnej Instytutu „Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka" pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Anny Tylki-Szymańskiej. W swoich badaniach mgr Anna Bogdańska opierała się na danych klinicznych i laboratoryjnych zebranych w Instytucie „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka" od roku 1995, w ramach procedur diagnostycznych zainicjowanych i wprowadzonych do praktycznego użytku przez profesor Ewę Pronickę oraz zespół diagnostów pod kierunkiem doktora Macieja Adamowicza.

Podstawę recenzowanej pracy doktorskiej stanowi cykl pięciu artykułów, z których cztery przedstawiają dane oryginalne i były opublikowane w czasopismach

międzynarodowych indeksowanych w bazie Web of Science a jeden to artykuł poglądowy opublikowany w czasopiśmie o zasięgu krajowym. Warto podkreślić, że pierwsze cztery prace łącznie posiadają współczynnik oddziaływania (Impact Factor) powyżej 9 i że wszystkie cztery były opublikowane w bieżącym roku.

Omawiana rozprawa na stopień doktora nauk medycznych ma objętość 124 stron, została starannie przygotowana pod względem edytorskim i wydana w formie książkowej. Wspomniane pięć artykułów poprzedzone jest krótkim wstępem, po którym w odrębnych rozdziałach przedstawiono cele prowadzonych badań (w sposób zwięzły i czytelny) oraz streszczenie (w języku polskim i angielskim). Następne rozdziały: „Wykaz publikacji" – zawierający niezbędne informacje bibliograficzne i bibliometryczne, a także zwięzłe „Omówienie" i prawidłowo sformułowane „Wnioski" poprzedzają bezpośrednio teksty pięciu publikacji źródłowych wraz z uzupełniającymi danymi. Dysertację zamykają: „Spis tabel i rycin", „Oświadczenia współautorów", „Zgoda Komisji Bioetycznej" i „Piśmiennictwo". Układ całości jest klasyczny i odpowiada układowi rozprawy na stopień doktora.

Doktorantka podjęła się oceny hipoglikozylacji transferyny – biochemicznego markera zaburzeń glikozylacji u polskich pacjentów z wrodzonym błędem metabolicznym oraz pacjentów z nabytymi schorzeniami wątroby, diagnozowanych w Instytucie „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka" w latach 1995-2020. W szczególności postanowiła oszacować częstość wrodzonych zaburzeń glikozylacji w Polsce, zanalizować ich podłoże molekularne i wreszcie określić diagnostyczne miejsce metody elektroogniskowania transferryny z materiału dostępnego w formie suchej kropli krwi. Szczegółowe cele ocenianej pracy są różnorodne, co umożliwiło kompleksowe podejście do badanych zagadnień i powstanie wartościowych publikacji.

Wrodzone zaburzenia glikozylacji należą do chorób rzadkich, definiowanych jako występujące rzadziej niż u jednej na 2000 osób. W badaniach dotyczących chorób rzadkich podstawowym problemem jest znalezienie odpowiednio licznych grup pacjentów a w publikacjach zawierających wyniki badań istotne jest przedstawienie dokładnego opisu analizowanych grup pacjentów. W pierwszym artykule „Clinical, biochemical and molecular phenotype of congenital disorders of glycosylation: long-term follow-up", opublikowanym w Orphanet Journal of Rare Diseases, dokładnie scharakteryzowano grupę 32 pacjentów diagnozowanych w Centrum Zdrowia Dziecka w latach 1995-2020. Pacjentów podzielono ze względu na wzór izoform transferryny na

dwie grupy: 12 dzieci z deficytem fosfomannomutazy 2 (PMM2-CDG) i 20 dzieci z innymi zaburzeniami. Długoletnia obserwacja zwłaszcza drugiej z powyższych podgrup zaowocowała interesującymi obserwacjami dotyczącymi objawów klinicznych. Główny wkład mgr Anny Bogdańskiej w powstanie powyższej pracy dotyczył jednak dokładnej analizy wieloletniej dynamiki profilu izoform transferyny u pacjentów. Przeprowadzone badania potwierdziły obserwacje opublikowane wcześniej przez innych autorów, jednak Doktorantce udało się również wykazać, że u niektórych pacjentów wzór izoform transferyny może być prawidłowy. Jest to nowa i bardzo istotna praktycznie obserwacja.

Powyższy artykuł jest przygotowany bardzo starannie i zawiera dużą ilość cennych danych źródłowych w formie materiałów dodatkowych. Nie do końca jasna wydaje się natomiast celowość statystycznej analizy korelacji odsetka poszczególnych izoform transferyny, zawartej w tabeli S2. Podobnie, analiza korelacji poszczególnych objawów klinicznych z typem zdiagnozowanego zaburzenia glikozylacji wydaje się mieć ograniczoną przydatność praktyczną ze względu na niewielką liczebność pacjentów w poszczególnych podgrupach i kliniczną heterogenność analizowanych zaburzeń.

Drugi artykuł, zatytułowany „Pediatric liver disease patients and secondary glycosylation abnormalities", opublikowany w czasopiśmie Frontiers in Pediatrics, dotyczy bardzo ciekawego w moim odczuciu zjawiska odwracalności zaburzeń glikozylacji transferyny w przypadku wystąpienia nabytej choroby wątroby. Praca ta ma istotną wartość kliniczną, zwłaszcza że doniesienia na ten temat w piśmiennictwie światowym są skąpe. Wykazanie faktu odwracalności zaburzeń glikozylacji u osób z nabytymi chorobami wątroby wydaje się świadczyć, że procedura potwierdzenia obecności wrodzonego zaburzenia powinna (w diagnostycznie wątpliwych przypadkach) uwzględniać badania molekularne, w tym sekwencjonowanie genomowe.

W stosunku do powyższej pracy mam również drobną uwagę: w pracy przeprowadzono liczne porównania statystyczne, jednak ze względu na małą liczebność badanych grup pacjentów (zwłaszcza grupy II i III) mają one raczej niewielkie znaczenie praktyczne.

W trzecim artykule, zatytułowanym „Congenital disorders of glycosylation: Prevalence, incidence and mutational spectrum in the Polish population", opublikowanym w Molecular Genetics and Metabolism Reports, przedstawiono charakterystykę polskiej populacji pacjentów pod względem mutacji genowych skutkujących wystąpieniem choroby. Praca ta ma dla polskich ośrodków pediatrii

metabolicznej istotną wartość poznawczą, ponieważ w odniesieniu do naszej populacji dotychczas nie publikowano podobnych danych. Ponadto, podobnie jak po lekturze poprzednio omawianego artykułu, nasuwa się wniosek, że ze względu na różnorodność stwierdzanych mutacji, diagnostyka molekularna powinna uwzględniać obszerne badanie molekularne – najlepiej badanie całoeksomowe. Dotyczy to oczywiście pacjentów z rzadszymi typami wrodzonych zaburzeń glikozylacji, u których wykluczono obecność PMM2-CDG.

Niska wykrywalność wrodzonych zaburzeń glikozylacji w polskiej populacji może mieć związek z niedostateczną świadomością dostępności odpowiednich metod diagnostycznych wśród pediatrów, przy jednoczesnej heterogenności klinicznej powyższych chorób.

Czwarty artykuł z cyklu stanowiącego podstawę recenzowanej rozprawy doktorskiej – „Transferrin isoform analysis from dried blood spots and serum samples by gel isoelectric focusing for screening congenital disorders of glycosylation" – został opublikowany w Acta Biochimica Polonica. W pracy oceniono przydatność analizy izoform transferyny w suchej kropli krwi. Udowodniono, że metoda ta może stanowić cenne uzupełnienie standardowej metody diagnostycznej bazującej na badaniu świeżej próbki krwi. Wykazano przydatność diagnostyczną materiału pobranego na bibułę stosowaną w badaniach przesiewowych noworodków, jeżeli niedostępna jest próbka pełnej krwi pacjenta. Doktorantka słusznie zauważa jednak, że technika analizy profilu izoform transferyny z suchej kropli krwi nie może być stosowana jako jedyna.

W artykule nie wyjaśniono natomiast bliżej jaki charakter ma opisywany genetyczny polimorfizm transferyny, który, sądząc z zamieszczonych zdjęć z elektroforezy, może potencjalnie sprawiać problemy diagnostyczne.

Piąty, ostatni artykuł z omawianego cyklu, zatytułowany „Wrodzone zaburzenia glikozylacji białek – stale powiększająca się grupa chorób metabolicznych" został opublikowany w czasopiśmie Postępy Biochemii, indeksowanym na liście Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Praca zawiera opis patogenezy, diagnostyki i kliniki wrodzonych zaburzeń glikozylacji i jest pozycją o charakterze referencyjnym, przydatną dla uporządkowania wiedzy na temat powyższych zaburzeń.

Piśmiennictwo w przedstawionej dysertacji obejmuje 122 pozycje, które są odpowiednio dobrane i adekwatnie cytowane. Drobna uwaga dotyczy obszerności „Streszczenia", które pełni w zasadzie funkcję omówienia artykułów stanowiących

podstawę rozprawy doktorskiej, podczas gdy „Omówienie" stanowi powtórzenie w formie skrótowej przedstawionych wcześniej informacji i pod względem objętości bardziej odpowiada streszczeniu. Nie umniejsza to jednak wartości przedstawionej dysertacji.

We wszystkich omówionych artykułach mgr Anna Bogdańska jest pierwszym autorem (samodzielnie lub jako autor równorzędny), co zostało potwierdzone zgodnymi oświadczeniami współautorów. Wkład autorski Doktorantki w powstanie prac był bez wątpienia decydujący. W moim odczuciu Autorka wykazała się niezbędną wiedzą teoretyczną, samodzielnością naukową a także dużą sprawnością w stosowaniu prawidłowo dobranych metod badawczych. Rozprawa doktorska stanowi oryginalne opracowanie zidentyfikowanych problemów badawczych a uzyskane wyniki mogą być zastosowane w praktyce diagnostycznej wrodzonych zaburzeń glikozylacji.

Deklarowany procentowy wkład współautorów w powstanie artykułów będących podstawą ocenianej dysertacji budzi natomiast pewne wątpliwości. Wydaje się, że zadeklarowany merytoryczny wkład Promotora wynoszący tylko 4% w pierwszych dwóch pracach cyklu jest zdecydowanie niedoszacowany, zwłaszcza że Promotor we wszystkich omawianych artykułach jest autorem korespondującym.

Podsumowując, pomimo drobnych uwag, poziom przedstawionej mi do recenzji rozprawy na stopień doktora nauk medycznych oceniam bardzo wysoko. Praca została przygotowana zgodnie z aktualnymi wzorcami przyjętymi na europejskich uniwersytetach. Uważam, że spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim i kwalifikuje mgr Anną Bogdańską do nadania stopnia doktora nauk medycznych. Zwracam się zatem do Rady Naukowej Instytutu „Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka" o dopuszczenie mgr Anny Bogdańskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie w związku z wysoką wartością naukową przeprowadzonych badań, udokumentowaną pięcioma publikacjami w renomowanych czasopismach specjalistycznych.

Mirosław Bik-Multanowski

Prof. dr hab. n. med. Mirosław Bik-Multanowski