

Dr hab. n. med. Monika Ołdak, prof. IFPS  
Zakład Genetyki  
Instytut Fizjologii i Patologii Słuchu  
ul. M. Mochnackiego 10  
02-042 Warszawa  
tel. 22-276-95-85  
[m.oldak@ifps.org.pl](mailto:m.oldak@ifps.org.pl)

Warszawa, 24 lutego 2020 r.

## **OCENA PRACY DOKTORSKIEJ**

**MGR INŻ. JOANNY ŚWIERKOWSKIEJ**

### **PT.: „CHARAKTERYSTYKA WYBRANYCH ASPEKTÓW (EPI)-GENETYCZNYCH W WYSOKIEJ KRÓTKOWZROCZNOŚCI U POLSKICH PACJENTÓW”**

wykonanej w Zakładzie Genetyki Nowotworów

Instytutu Genetyki Człowieka

Polskiej Akademii Nauk

pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Marzeny Gajęckiej

oraz dr inż. n. farm. Justyny A. Karolak (promotor pomocniczy)

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Joanny Świerkowskiej podejmuje aktualne i ważne ze względów społecznych i medycznych, ale jednocześnie bardzo trudne zagadnienie określenia udziału uwarunkowań genetycznych i epigenetycznych w rozwoju wysokiej krótkowzroczności. Dane epidemiologiczne wskazują na alarmujący wzrost liczby osób z krótkowzrocznością. W Polsce około jedna czwarta populacji osób dorosłych dotknięta jest tą wadą wzroku. Wyniki badań naukowych dowodzą udziału różnych czynników środowiskowych zwiększających ryzyko rozwoju krótkowzroczności, jak również udziału uwarunkowań genetycznych w patogenezie tej choroby. Procesy epigenetyczne stanowią istotny łącznik pomiędzy indywidualną konstytucją genetyczną i oddziaływaniem środowiska, wpływając na regulację ekspresji genów. Badania nad rolą czynników genetycznych w rozwoju wysokiej krótkowzroczności w populacji polskiej pochodzą przede wszystkim z zespołu kierowanego przez Panią Prof. Marzenę Gajęcką, promotora niniejszej pracy. Zadania badawcze podjęte w tej rozprawie doktorskiej stanowią zatem kontynuację obszaru zainteresowań i osiągnięć promotora, jak również promotora pomocniczego Pani Dr Justyny Karolak. Z uznaniem należy przyjąć wybór aktualnego tematu pracy doktorskiej.



Praca doktorska p. mgr inż. Joanny Świerkowskiej ma charakter i układ typowy dla rozpraw doktorskich. Liczy 154 strony i zawiera 12 rycin, 62 tabele, 7 tabel zamieszczonych jako załączniki oraz starannie dobrane, aktualne i właściwe zacytowane piśmiennictwo.

Wstęp pracy doktorskiej został podzielony na 7 głównych części, w których Doktorantka krótko przedstawia zasadę tworzenia obrazu widzianych przedmiotów, charakterystykę kliniczną i typy klasyfikacji krótkowzroczności. Następnie przechodzi do omówienia epidemiologii krótkowzroczności i czynników środowiskowych warunkujących jej powstawanie. Najwięcej miejsca we Wstępie poświęconego jest aktualnemu stanowi wiedzy na temat roli czynników genetycznych w etiologii krótkowzroczności. Tę część rozprawy Doktorantka kończy przedstawieniem zwięzłego uzasadnienia podjęcia tematu pracy badawczej. Wstęp pracy został przygotowany starannie i oceniam go jako niezwykle wartościowy. Stanowi on przegląd aktualnej wiedzy na temat uwarunkowań genetycznych i epigenetycznych w powstawaniu krótkowzroczności. Pewien niedosyt pozostawia jednak pominięcie we Wstępie choćby krótkiego przedstawienia parametrów okulistycznych, które w dalszej części pracy są szeroko porównywane. Ich analiza jest jednym z czterech celów szczegółowych pracy.

Cele pracy, zarówno cel ogólny przedstawiony jako „...identyfikacja nowych czynników (epi)-genetycznych zaangażowanych w etiologię wysokiej krótkowzroczności u polskich pacjentów”, jak i cele szczegółowe zawarte w 4 punktach zostały jasno i logicznie sprecyzowane, i wynikają z przesłanek opisanych we Wstępie. Przechodząc do tej części pracy staje się jasne, dlaczego przedrostek „epi-” w tytule pracy doktorskiej został umieszczony w nawiasie. Celem badań p. mgr inż. Joanny Świerkowskiej była nie tylko analiza całogenomowej metylacji DNA jako jednego z elementów procesów epigenetycznych u dzieci z wysoką krótkowzrocznością, ale również poszukiwanie związku wariantów sekwencji DNA z występowaniem wysokiej krótkowzroczności i z różnymi parametrami okulistycznymi.

Materiały i metody zawierają szczegółowe informacje o badanych pacjentach i charakterystykę badanych grup, wzbogaconą graficznym przedstawieniem rodowodów, uczestniczących w badaniu, rodzin. Ta część pracy zawiera również dokładny spis stosowanych odczynników, aparatury oraz listę baz danych i narzędzi bioinformatycznych, które były wykorzystane przez Doktorantkę. W tej części pracy wymienione są również badania okulistyczne, którym poddawani byli pacjenci oraz niezwykle starannie opisane zwłaszcza metody analiz statystycznych i metodyka badań genetycznych i epigenetycznych, stosowanych przez Doktorantkę. Przygotowanie materiału, analiza i weryfikacja wyników sekwencjonowania wysokoprzepustowego oraz analiza wyników całogenomowej metylacji i ich walidacja zostały przeprowadzone zgodnie z obowiązującą wiedzą i zasadami.

Cześć rozprawy doktorskiej zawierająca wyniki badań została przygotowana niezwykle szczegółowo i stanowi podstawowy element rozprawy doktorskiej. Ponad połowę tej części pracy



zajmuje wieloaspektowa analiza danych klinicznych pozyskanych od członków polskich rodzin z dziedziczną wysoką krótkowzrocznością, z uwzględnieniem statystyki opisowej, testowej i analizy korelacji parametrów okulistycznych. Szkoda, że tak ciekawe z punktu widzenia klinicznego wyniki badań, wykazujące bardzo istotne statystycznie różnice nie znalazły swojego odzwierciedlenia w tytule pracy doktorskiej i mogą umknąć uwadze praktyków klinicznych i naukowców.

Zajmując się wariantem c.1049G>T w genie *ZC3H13*, Doktorantka podsumowuje, że nie ma zgodności między wynikami sekwencjonowania eksomowego, które wskazują, że wariant jest heterozygotyczny, a wynikami sekwencjonowania metodą Sangera pokazującymi, że zmiana w tym genie obecna jest u badanego pacjenta w układzie homozygotycznym i została odziedziczona od jednego z rodziców. Tym samym Doktorantka podejrzewa wystąpienie u badanego pacjenta delecji w tym regionie, co tłumaczyłoby obserwowaną homozygotyczność zmiany w sekwencjonowaniu metodą Sangera. Uważam, że analizując ten wynik należałoby jeszcze głębiej zastanowić się nad różnicami w zasadach działania obu metod sekwencjonowania, jak również, skąd w sekwencjonowaniu eksomowym pojawiły się odczyty nie tylko dla sekwencji z analizowanym wariantem, ale również dla sekwencji referencyjnej. Moim zdaniem prawdopodobnym wytłumaczeniem tych rozbieżności może być brak amplifikacji jednego allelu genu *ZC3H13* zawierającego sekwencję referencyjną w reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR), która jest podstawowym elementem sekwencjonowania metodą Sangera. Może się to zdarzyć, jeżeli zaprojektowany starter nie wiąże się komplementarnie z sekwencją matrycową, na przykład na skutek występowania w miejscu wiązania alternatywnego wariantu sekwencji. W tym wypadku mogłoby to mieć miejsce dla jednego allelu genu *ZC3H13* zawierającego sekwencję referencyjną. Wówczas nie powstawałby produkt PCR z tego allelu, dając obraz pozornie homozygotycznego wariantu c.1049G>T w genie *ZC3H13* u pacjenta i obecność tej zmiany tylko u jednego z rodziców. Prostą metodą weryfikacji tego przypuszczenia byłoby ponownie wykonanie sekwencjonowania metodą Sangera w badanej rodzinie z wykorzystaniem innej pary starterów do reakcji PCR.

Weryfikując wyniki sekwencjonowania eksomowego Doktorantka identyfikuje warianty genów *ABCC6*, *FLRT3* i *SLC35E2B* jako specyficzne dla pojedynczych rodzin i stwierdza, że nie segregują one z fenotypem wysokiej krótkowzroczności w pozostałych badanych rodzinach. Weryfikacja wyników sekwencjonowania eksomowego odbywała się z wykorzystaniem różnych kryteriów filtrowania. Przedstawione analizy ograniczały się do wytypowanych genów mogących mieć związek z patologią narządu wzroku. Czytając tę część pracy zastanawiałam się, czy Doktorantka w swoich analizach brała pod uwagę poszukiwanie wspólnego wariantu genetycznego lub różnych wariantów w tym samym genie dla wszystkich lub większości pacjentów z wysoką krótkowzrocznością poddanych sekwencjonowaniu eksomowemu. Wówczas mogłaby spojrzeć



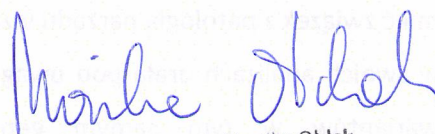
szeroko na otrzymane wyniki bez konieczności zawężania analiz do grupy genów powiązanych z funkcjonowaniem narządu wzroku lub stwierdzoną ekspresją w oku.

Bardzo obiecującą częścią pracy są wyniki całogenomowej metylacji DNA. Doktorantka identyfikuje zarówno obszary hiper- jak i hipometylowane u pacjentów z wysoką krótkowzrocznością i identyfikuje ścieżki sygnałowe, które mogą odgrywać rolę w etiologii krótkowzroczności, tym samym zostają wytyczone dalsze kierunki badań nad powstawaniem wysokiej krótkowzroczności u polskich pacjentów.

W części Wyniki moją uwagę zwróciły również drobne nieścisłości. W różny sposób przedstawiono wytypowane do weryfikacji warianty genetyczne. W większości tabel nie podano numerów sekwencji referencyjnych i stosowano wymiennie skróty jedno- i trzyliterowe dla aminokwasów. Doktorantka posłużyła się nieprecyzyjnymi, choć potocznie używanymi określeniami np. „nadciśnienie”, „astma”, „zawał serca” przy charakterystyce chorób współistniejących w grupie badanych pacjentów, mając na myśli najprawdopodobniej „nadciśnienie tętnicze”, „astmę oskrzelową” i „zawał mięśnia sercowego”. Najpewniej błędem edytorskim w tabeli nr 14 przy opisie pacjenta HM-71-03 jest obecność obok słowa „nadciśnienie” również określenia „nadciśnienie tętnicze”.

W części Dyskusja Doktorantka przechodzi do omówienia uzyskanych wyników. Ta część pracy podzielona jest na 5 podrozdziałów, w których Doktorantka bardzo szczegółowo odnosi się do otrzymanych danych, przedstawiając je w szerokim kontekście innych badań i ogólnej wiedzy na temat powstawania krótkowzroczności. Dyskusję kończy jednostronicowe podsumowanie. Dyskusja jest dobrze napisana i wskazuje, że Doktorantka posiada umiejętność krytycznej oceny wyników badań naukowych. Rozprawę doktorską kończą wnioski, które w sposób właściwy odnoszą się do uzyskanych wyników.

Z wyjątkiem powyższych uwag i drobnych niedociągnięć (kilkakrotnie niedokończone zdania, drobne błędy edytorskie) nie stwierdzam żadnych istotnych uchybień w przedstawionej mi do oceny pracy doktorskiej. Praca doktorska p. mgr inż. Joanny Świerkowskiej spełnia ustawowe wymogi stawiane rozprawom na stopień doktora i Doktorantka uzyskała dojrzałość naukową uprawniającą ją do starania się o ten stopień naukowy. Zwracam się do Wysokiej Rady o przyjęcie recenzji pracy doktorskiej i dopuszczenie Pani mgr inż. Joanny Świerkowskiej do dalszego etapu postępowania i publicznej obrony.



Dr hab. n. J. Monika Otdak  
specjalista genetyki klinicznej  
1650724