



Dr hab.n.med. Henryk Mazurek
Klinika Pneumonologii i Mukowiscydozy
Oddział Terenowy IGiChP
34-700 Rabka – Źródło
Ul. Prof. Rudnika 3b

RECENZJA

rozprawy doktorskiej magister Małgorzaty Kurkowiak pt. "Analysis of new genes involved in Primary Ciliary Dyskinesia"

Zespół pierwotnej dyskinezy rzęsek (*Primary Ciliary Dyskinesia, PCD*) to grupa uwarunkowanych genetycznie schorzeń, w których stwierdza się niesprawny klirens śluzowo-rzęskowy, prowadzący do nawrotowych, a później przewlekłych zakażeń bakteryjnych układu oddechowego. Występuje prawdopodobnie co najmniej dwukrotnie rzadziej niż mukowiscydoza (~1: 10 000 – *Lucas SC et al. 2014*). W okresie noworodkowym częste jest pojawienie się zaburzeń oddychania (o niejasnej przyczynie) oraz obecny od urodzenia nieżyt nosa. U połowy dzieci stwierdza się odwrócenie trzew, a częstość występowania wad rozwojowych (serca, CUN) jest wyższa niż w populacji. Typowe jest współistnienie przewlekłych dolegliwości ze strony dolnych i górnych dróg oddechowych, w tym przewlekające się stany zapalne ucha środkowego. Wczesnie pojawia się produktywny kaszel, a okresowo występują zapalenia oskrzeli / płuc. Z czasem dochodzi do rozwoju rozstrzeni oskrzeli. U dzieci w wieku powyżej 4 lat badaniem przesiewowym jest pomiar stężenia tlenu azotu w powietrzu wydychanym przez nos. Stwierdzenie niskich wartości (<200 ppb, zwłaszcza <100 ppb) wymaga wykonania decydujących dla ustalenia rozpoznania badań, nie ma jednak pojedynczego, dostępnego i prostego w interpretacji testu diagnostycznego w kierunku PCD. Ustalenie rozpoznania ma miejsce w oparciu o badania ruchomości rzęsek (ocena częstotliwości oraz poprawności ruchu - *high frequency video microscopy, HFVM*) i ich ultrastruktury (mikroskopia elektronowa). W potwierdzeniu rozpoznania PCD rosnące znaczenie ma wykrywanie mutacji genów odpowiedzialnych za strukturę i funkcjonowanie rzęsek.

W tym kontekście **wybór tematu pracy doktorskiej** przez Panią Małgorzatę Kurkowiak należy ocenić pozytywnie, jako bardzo trafny w aspekcie zarówno poznawczym

jak i praktycznym. Podjęcie tematu przez mgr Małgorzatę Kurkowiak, dokonane w pracy doktorskiej, stwarza szansę na istotne pogłębienie wiedzy tym w zakresie.

Tytuł pracy precyzyjnie oddaje jej treść.

I. Ocena formy pracy

Skrypt pracy mgr Małgorzaty Kurkowiak na stopień doktora nauk medycznych składa się z 76 stron tekstu zasadniczego, podzielonego na rozdziały w sposób obowiązujący w opracowaniach naukowych, tj.: *Introduction (Wprowadzenie)* – *Aims of PhD thesis (Cel pracy)* – *Material and methods (Materiał i metody)* – *Results (Wyniki)* – *Discussion (Dyskusja)* – *Conclusions (Wnioski)*, co jest przejrzyste zestawione w *Table of contents (Spis treści)*. Dodatkowo znajdujemy umieszczony na początku *Wykaz stosowanych skrótów (Abbreviations)*, który jest znacznym ułatwieniem dla osób nie obznajomionych z mianownictwem biologicznym. Wykaz *Piśmiennictwa (Literature)* stanowiący zestawienie uwzględnionych niemal 200 publikacji (wyłącznie anglojęzycznych), ułożony jest w kolejności alfabetycznej. Ponadto w pracy znajdują się 8 tabel i 18 kolorowych rycin, umieszczonych w tekście pracy w sposób ciągły. Nietypowo, bo na początku opracowania umieszczone *Streszczenie* stanowi uzupełnienie tekstu dysertacji, reasumując najistotniejsze elementy opracowania (nieco obszerniej niż *Abstract* w języku angielskim). Ponadto w ośmiu *Tabelach dodatkowych (Supplementary tables)* znajdujemy wyszczególnienie technicznych detali zastosowanych metod oraz niektórych danych klinicznych badanych chorych.

Streszczenie i *Abstract* ułatwiają szybkie zapoznanie się z najistotniejszymi fragmentami treści pracy, przed przystąpieniem do uważnego jej studiowania. Nic co ważne w pracy nie zostało w tych streszczeniach pominięte.

Obszerny *Wstęp (Introduction)* sprawnie wprowadza w przedstawiane zagadnienie i daje sposobność do racjonalnego wywodu celu badania. Jego długość wynosi 41% całej pracy.

Cel badania (Aims of the PhD thesis) jest przedstawiony w formie uogólnionego wiodącego zamierzenia i dwu zadań szczegółowych, wymienionych w punktach.

Przykładnie treściwy a zarazem dostatecznie szczegółowy jest opis *Metodyki badań (Material and methods)*, zajmujący 11% pracy. Prezentacja *Wyników (Results)* zajmuje 34% pracy, a następująca po nich *Dyskusja (Discussion)* jest przeprowadzona w sposób logiczny i dojrzały, choć jest nieco krótsza (12%) od wyników, ale nie w stopniu budzącym formalne zastrzeżenia. Najszersze części pracy (*Wstęp*, opis *Materiału i metod* badań, *Wyniki* oraz *Dyskusja*) są podzielone na podrozdziały, co zwiększa przejrzystość prezentacji.

Wnioski (*Conclusions*) stanowią odpowiedź na szczegółowe pytania wymienione w celu pracy, przy czym odpowiedź na zagadnienie nr 2 została rozdzielona na 3 wnikliwie konkluzje.

Zestawione w **Piśmiennictwie** (*Literature*) pozycje są cytowane w stosownych fragmentach tekstu, co świadczy o ich rzeczywistym wykorzystaniu.

W zewnętrznej ocenie formy skryptu doktorskiego z przyjemnością można pochwalić jego przejrzysty układ oraz staranne wydanie pracy. Tabele i kolorowe ryciny są umieszczone w strumieniu tekstu, co ułatwia zapoznavanie się z pracą.

II. Ocena merytoryczna pracy.

Większość skrótów użytych w tekście pracy jest opisana przy użyciu po raz pierwszy, a zastosowane w skróty są zgodne z obowiązującą terminologią.

Rozważania we wstępie przedstawiają omówienie ultrastuktury rzęsek, ze szczegółowym opisem aktualnego stanu wiedzy na temat budowy i funkcji głównych białek rzęsek. Przedstawiona jest również zwięzła charakterystyka PCD oraz głównych metod diagnostyki wrodzonych zaburzeń ruchomości rzęsek, ze szczególnym podkreśleniem miejsca i roli badań genetycznych.

Na tym tle uzasadniony jest **Cel badania**, z wyróżnieniem przez Autorkę 2 pytań szczegółowych, opisujących gruntownie wszystkie zaplanowane analizy.

Pani Małgorzata Kurkowiak podjęła się próby rozwiązania zawartego w tytule pracy problemu w oparciu o analizę wyników zaprojektowanego i zrealizowanego przez siebie badania. Praca wykonywana była w ramach projektu Międzynarodowe Projekty Doktoranckie, a badania prowadzone były w Zakładzie Genetyki Molekularnej i Klinicznej Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu oraz w Laboratorium Kliniki i Polikliniki Chorób Dzieci i Młodzieży w Munster (Niemcy). Autorka badała materiał genetyczny oraz próbki nabłonka, zgromadzone w wymienionych ośrodkach.

Opis zastosowanych metod jest zwięzły, ale wydaje się być precyzyjny. Zastosowana metodologia badań jest swoista dla biologii molekularnej i jest trudna do oceny przez klinicystę. Po wytypowaniu regionów, w których można było się spodziewać sprawczych mutacji w genach istotnych w patogenezie PCD, Autorka przeprowadziła analizę wyłonionych genów – kandydatów. Połączone to było z analizą ultrastruktury rzęsek, ocenianej z użyciem mikroskopu elektronowego.

Szczegółowe przedstawienie wyników analizy oraz ich omówienie stanowią zasadniczą część dysertacji. Przedstawione przez autorkę wyniki analiz są przedstawione

czytelnie. Autorka dokonała identyfikacji 10 nowych mutacji w obrębie trzech genów (LRRC6, ZMYND10 i CCDC151). Analiza ultrastruktury rzęsek nabłonka pochodzącego od chorych ze zidentyfikowanymi mutacjami potwierdziła brak zewnętrznych i wewnętrznych ramion dyneinowych. Te dane wraz z wynikami uprzednich badań na organizmach modelowych wskazują na rolę białek kodowanych przez te geny jako białek cytoplazmatycznych, uczestniczących w procesie składania ramion dyneinowych.

Związła dyskusja stanowi omówienie własnych spostrzeżeń, w porównaniu z dostępnymi danymi z literatury medycznej przedmiotu. Autorka zwraca uwagę na liczne przyczyny rozbieżności wyników uzyskiwanych przez różnych autorów, a także przedstawia możliwe aplikacje uzyskanych wyników. Przeprowadzone rozumowanie jest przekonujące, a dyskusja z innymi badaczami dokonywana logicznie i z dużą swobodą, co świadczy o dogłębnej znajomości naukowych podstaw zagadnienia i nabyciu umiejętności krytycznego rozumowania.

Spośród cytowanych ponad 190 pozycji piśmiennictwa, zdecydowana większość została opublikowana w latach 2005 – 2014. Cytowane źródło internetowe jest również poprawnie przywołane.

Związłe wnioski mają duże znaczenie poznawcze i praktyczne. Szczególnie ważne jest poszerzanie obszarów, w których możliwe jest potwierdzenie obecności mutacji. Z jednej strony, pozwala to zmniejszyć odsetek chorych o niepotwierdzonym genetycznym podłożu PCD, z drugiej strony, otwiera możliwości przyszłych interwencji terapeutycznych. Równocześnie uzasadnia to celowość dalszych badań zmierzających do możliwie pełnego ustalenia genetycznych przyczyn PCD. W kontekście niezbyt licznych danych na temat częstości występowania poszczególnych mutacji w Polsce, ważne są obserwacje Pani Krakowiak dotyczące częstości występowania badanych mutacji w Polsce.

Najistotniejsze dla mnie zdecydowanie jest jednak wykrycie przez Panią Małgorzatę Kurkowiak nowych mutacji w zakresie genów kodujących procesy niezbędne dla prawidłowego formowania struktury rzęsek. Wyniki te potwierdzają niewątpliwą przydatność diagnostyki genetycznej PCD, ale z drugiej strony zwracają uwagę na jej trudności (czułość ~65%) oraz otwierające się perspektywy dalszych badań.

Wysoko należy docenić ograniczenie się przez Małgorzatę Kurkowiak do przedstawienia tylko wniosków dotyczących spostrzeżeń w zakresie określonym w tytule pracy. Wnioski pani Małgorzaty Kurkowiak mają duże znaczenie poznawcze i praktyczne, a w przyszłości być może przełożą się na nowe terapie. Rzetelnie wykonane opracowanie

przyniosło ważne spostrzeżenia na temat występowania mutacji w polskiej populacji chorych na PCD.

Przedstawione szczegółowo wyniki badań, mogą być niewątpliwie wykorzystane w praktyce, na co Autorka zwraca uwagę w końcowym rozdziale pracy doktorskiej.

Z obowiązku recenzenta chciałbym zwrócić uwagę na to, że mimo widocznej najwyższej staranności przy opracowaniu edycji tekstu, zdarzają się nieliczne błędy redakcyjne:

Na liście przygotowanych przez Autorkę prezentacji posterowych znajduje się udział w konferencji – bez prezentacji plakatu. Na str. 9 (Streszczenie) wśród objawów PCD wymienione jest sformułowanie „randomizacja narządów wewnętrznych”, zamiast „losowy układ symetrii narządów wewnętrznych”. Nie wszystkie skróty mają pełne rozwinięcie przy pierwszym pojawieniu się w tekście (np. IFT – str.18), co może zmuszać do sięgania do ich wykazu na początku opracowania. Swego rodzaju pętla logiczna pojawia się na str. 30 w stwierdzeniu „*Central pair (CP) of microtubules is present only in cilia and flagella with the 9+2 pattern*”. Jako klinicysta muszę też podkreślić, że w opisie objawów RDS obserwowanych u noworodków z PCD (str.35) konieczne jest podkreślenie, że nie są one związane z ich wiekiem płodowym. Ponadto przy opisie częstości ruchu rzęsek jako obniżonej przy wartości poniżej 11 Hz (str. 37), konieczne jest zaznaczenie, że jest to wartość odcięcia istotna przy ocenie dokonywanej w temp. 37° C. Na tej samej stronie znajdujemy stwierdzenie, że „*a high speed camera attached to microscope enables to record more than 500 frames per second*”, co jest prawdziwe tylko w odniesieniu do części modeli. Przykładowo, Autorka korzystała z kamery rejestrującej zapis z częstością 125 lub 250 klatek na sekundę (str. 56).

Nie jest jasne, jaka liczbę genów – kandydatów Autorka badała: 20 (str. 57) czy 24 (str. 10).

Przytaczane na str. 38 – 39 wartości odcięcia dla przyływu (wydatku) nNO są zgodne z sugestiami z piśmiennictwa, ale nadal w praktyce powszechnie stosuje się ocenę stężenia nNO.

Choć stwierdzenie „*ciliary motility assessed as normal in the fresh biopsy, turned out to be abnormal after ciliogenesis in culture*” (str. 38) jest zgodne z publikacją Boon i wsp. (2014), ale musi być traktowane z rezerwą. Nie ulega wątpliwości, że hodowla pozwala na wykluczenie wtórnych zmian ultrastruktury rzęsek, powstałych u osób zdrowych wskutek infekcji lub narażenia na wdychane substancje szkodliwe. O ile niekwestionowana wydaje się prawdziwość stwierdzenia, zawartego w cytowanej w tym miejscu przez Autorkę pracy

Pifferi et al.2013b: „*after ciliogenesis in culture, ciliary cells obtained by PCD patients will maintain an abnormal ciliary motion, while those obtained by subjects with secondary dyskinesia will gain a normal ciliary function*”, to trudno się zgodzić bez zastrzeżeń z prawdziwością powyższego stwierdzenia, pochodzącego z pracy Boon i wsp., ponieważ nie można wykluczyć wtórnych zmian ruchomości rzęsek powstałych w hodowli, a związanych z jej warunkami (np. niedobór pewnych składników lub obecność substancji o potencjalnym działaniu toksycznym jak np. antybiotyki).

Wspomniane niewielkie usterki redakcyjne w żaden sposób nie umniejszają merytorycznej wartości pracy doktorskiej Pani Małgorzaty Kurkowiak. Uważam, że Pani Małgorzata Kurkowiak w przedstawionej dysertacji doktorskiej wykazała bardzo dobre przygotowanie do pracy naukowej i dowiodła posiadania umiejętności samodzielnego rozwiązywania zagadnień. Nieliczne zastrzeżenia dotyczą szczegółów redakcji pracy łatwych do skorygowania, lub które mogą być wyjaśnione w trakcie obrony pracy. Praca Małgorzaty Kurkowiak zatytułowana „*Analysis of new genes involved in Primary Ciliary Dyskinesia*” jest przeze mnie oceniona pozytywnie, ponieważ spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim i wnosi informacje ważne dla nauki oraz praktyki klinicznej. Poszerza to naszą znajomość procesów dziedziczenia oraz epidemiologii mutacji u chorych z PCD. Ma to również ogromny aspekt praktyczny, ponieważ przybliża nas do etapu, kiedy prawdopodobnie diagnostyka genetyczna stanie się szerzej dostępnym narzędziem diagnostycznym, podobnie jak ma to miejsce w przypadku mukowiscydozy. Ponadto białka cytoplazmatyczne, których geny badała autorka, mogą stać się potencjalnym celem nowych terapii.

O znakomitym przygotowaniu doktorantki świadczy jej dotychczasowy dorobek, uwzględniający prace opublikowane w pismach umieszczonych na tzw. liście filadelfijskiej, a o jej dalszej aktywności przedstawione dotychczas publikacje posterowe z lat 2011 – 2013.

Wspomniane zalety pracy sprawiają że niewątpliwie **praca zasługuje na wyróżnienie (o ile regulamin Wysokiej Rady dopuszcza takową procedurę).**

Z poczuciem przekonania **przedkładam Wysokiej Radzie Instytutu Genetyki Człowieka w Poznaniu wniosek o dopuszczenie magister Małgorzaty Kurkowiak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Dr hab.n.med. Henryk Mazurek, prof. nadzw.

Kierownik Kliniki Pneumonologii i Mukowiscydozy
ZP IGiChP w Rabce - Zdrój