

RECENZJA

**rozprawy doktorskiej lek. Zofii Kolesińskiej
pt. „Identification of the genetic background
in 46,XY disorders of sex development”**

Zaburzenia rozwoju płci (ZRP) obejmują zgodnie z konsensusem opublikowanym w 2006 r. wrodzone zaburzenia, w których stwierdza się nieprawidłowy rozwój płci genetycznej, chromosomalnej ale także płci fenotypowej, gonadalnej. Wśród zaburzeń tych wyróżnia się trzy podstawowe typy:

- 1) związany z zaburzeniami chromosomalnymi,
- 2) związany z kariotypem męskim (46,XY),
- 3) związany z kariotypem żeńskim (46,XX).

Uwzględniając tę definicję, częstość występowania ZRP określa się nawet na 1/100 żywych urodzeń, natomiast w przypadku obecności kariotypu 46,XY zaburzenia te występują u mniej niż 1 na 10 000 żywych urodzeń. Ze względu na rzadkie występowanie tego zaburzenia zarówno jego podłoże genetyczne jak i długotrwałe konsekwencje w wielu przypadkach nie zostały jeszcze dokładnie poznane. Podkreśla się występowanie szerokiego wachlarza manifestacji klinicznych u chorych z kariotypem 46,XY ale też i u innych chorych z ZRP co niesie ze sobą ryzyko, że pacjenci ci nie zostaną w odpowiednim czasie objęci właściwą

opieką, często wymagającą zaangażowania specjalistów wielu dyscyplin. U chorych z ZRP i kariotypem 46,XY mogą pojawić się zaburzenia rozwoju gonad, syntezy androgenów czy też zaburzenia działania hormonów androgennych. Szczegółowe badania genetyczne prowadzone u tych chorych mogą dostarczyć informacji na temat rozwoju choroby i umożliwić odpowiednio wczesne włączenie terapii. Obecnie stosowane nowe technologie w badaniach genetycznych takie jak sekwencjonowanie następnej generacji (ang. *Next-Generation Sequencing, NGS*) czy całościowe badania sekwencji kodujących lub też badania całego genomu stwarzają możliwości m.in. wykrycia zarówno nowych defektów jednogenowych jak i potwierdzenia udziału wielu genów w patogenezie określonego zaburzenia.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska dotycząca podłoża genetycznego u chorych z zaburzeniem rozwoju płci i kariotypem 46,XY ma typowy układ - obejmuje 78 stron i jest podzielona na 7 głównych rozdziałów oraz 5 rozdziałów pomocniczych i jest napisana w języku angielskim. W tekście zamieszczono 8 tabel i 10 rycin, a wykorzystane w rozprawie piśmiennictwo obejmuje 87 pozycji. Badania będące podstawą tez doktorskich zostały sfinansowane w ramach grantu NCN nr 2014/13/N/NZ5/00448 i uzyskały zgodę właściwej komisji bioetycznej.

We **wstępie** pracy Doktorantka zawarła informacje na temat zaburzeń rozwoju płci włączając w to opis determinacji płci męskiej i różnicowania płci w okresie prenatalnym a także przedstawiła zaburzenia: rozwoju gonad, syntezy androgenów i działania hormonów androgennych. We wstępie znalazły się również dane na temat nowych markerów czynności gonad takich jak: AMH czy inhibina B. Opisano także metodę sekwencjonowania następnej generacji (NGS). Wstęp napisany jest w sposób zwięzły tym niemniej zawiera dużą ilość bardzo istotnych informacji potrzebnych do dalszego zrozumienia podjętych celów,

zastosowanej metodyki i interpretacji wyników. Rozdział ten w pełni uzasadnia wybór tego bardzo oryginalnego tematu rozprawy.

Cele badawcze pracy zostały jasno sformułowane i obejmowały ocenę kliniczną, biochemiczną i radiologiczną u chorych z zaburzeniami różnicowania płci o kariotypie 46,XY, identyfikację podłoża genetycznego choroby u tych chorych z wykorzystaniem masowego równoległego sekwencjonowania, korelację otrzymanych wyników badań klinicznych i dodatkowych z wynikami badań genetycznych oraz utworzenie algorytmu postępowania diagnostycznego z wykorzystaniem badań molekularnych u chorych z ZRP o kariotypie 46,XY.

Badaniami objęto 35 pacjentów z ZRP i kariotypem 46,XY z czego 21 miało nadaną płć męską a 14 płć żeńską. Wszyscy chorzy byli pod opieką Kliniki Endokrynologii i Reumatologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Zakwalifikowani pacjenci po badaniach zostali odpowiednio sklasyfikowani uwzględniając zaburzenie rozwoju gonady męskiej, zaburzenia syntezy jak i działania androgenów. Wyróżniono także pacjentów z ZRP i zespołem wad. Badana grupa chorych w bardzo szczegółowy sposób została opisana w rozdziale „Wyniki”.

Badania genetyczne prowadzono stosując technologię wysokoprzepustowego sekwencjonowania następnej generacji przy pomocy platformy firmy Illumina. Do badań wykorzystano bibliotekę genową obejmującą 54 geny w tym geny biorące udział w rozwoju gonad, syntezie androgenów z towarzyszącą prawidłową i nieprawidłową funkcją kory nadnerczy, geny związane z czynnością hormonów androgennych, z powstawaniem innych form ZRP a także z hipogonadyzmem hipogonadotropowym czy wielohormonalną niedoczynnością przysadki. Analiza bioinformatyczna została przeprowadzona z wykorzystaniem programu Saphetor (Lozanna, Szwajcaria). W metodyce nie podano jednak

długości pojedynczego odczytu dla przeprowadzonego sekwencjonowania a ta informacja jest istotna dla określenia specyficzności reakcji.

Do określenia znaczenia patogenności wariantu genetycznego wykorzystano bazy danych takie jak: ExAC i ClinVar z uwzględnieniem kryteriów ustanowionych przez American College of Medical Genetics and Genomics. Zgodnie z tymi kryteriami mutacje zostały określone jako warianty patogenne, warianty potencjalnie patogenne i warianty o nieokreślonej patogenności. Zastosowana metodyka i systemy analizy danych świadczą o dużym doświadczeniu badawczym Doktorantki i znajomości nowoczesnych technik analiz genetycznych.

Wyniki badań przedstawiono w tabelach i w sposób opisowy. Badania wykazały obecność 22 mutacji w badanych genach u chłopców i 19 mutacji u dziewczynek. Najczęściej stwierdzano mutacje w genie receptora androgenów. U 5 pacjentów wykazany defekt miał charakter wielogenowy. Diagnoza genetyczna najlepiej korelowała z grupą chorych ze stwierdzonym zaburzeniem działania androgenów. Wyniki zgodności rozpoznania klinicznego ze zidentyfikowanymi defektami genetycznymi umieszczono w bardzo dobrze skonstruowanej tabeli 8. Dzięki temu w przejrzysty sposób Doktorantka przedstawiła najbardziej istotne korelacje kliniczno-genetyczne. Aczkolwiek w wynikach badań brakuje informacji dotyczących wyników predykcji patogenności *in silico* z wykorzystaniem narzędzi bioinformatycznych PolyPhen2 i SIFT, o których wspomniano w metodyce. Zwłaszcza, że oba algorytmy różnią się sposobem określania patogenności mutacji. W tabelach 6 i 7 (zarówno w tytułach tabeli jak i oznaczeniu kolumn) zamiast określenia „Variant call” powinno być użyte sformułowanie „Pathogenicity” lub „Clinical significance”. gdyż „Variant call” w większości programów do analizy sekwencji NGS jest używany do określenia zmiany nukleotydu. Brakuje też odniesienia do wspomnianych w tytule obu tabeli danych z piśmiennictwa - choćby w formie cytacji.

W rozdziale „Dyskusja” Doktorantka w interesujący sposób i wskazujący na szeroką znajomość tematu omawia wyniki swoich badań i odnosi je do dotychczas opublikowanych informacji na temat uwarunkowań genetycznych ZRP. Dyskusję kończy algorytm zintegrowanego postępowania diagnostycznego z zastosowaniem metod badań genetycznych w zaburzeniach rozwoju płci. Wyciągnięte przez Doktorantkę wnioski są odpowiednio umotywowane otrzymanymi wynikami i odpowiadają założonym celom pracy.

Pracę czyta się z ogromną przyjemnością, jest napisana bardzo przejrzysto i w sposób zwarty, bez zbędnych informacji. Rozprawa jest wyjątkowo starannie przygotowana aczkolwiek znalazły się w niej trzy drobne błędy literowe: na stronie 21 zamiast skrótu OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*) występuje skrót OMIN, na stronie 45 i 47 (tabela 8) zamiast LHX4 wpisano LHXR, a na stronie 51 „polish cohort” napisano z małej litery. Dodatkowo skrót HGVS oznacza „Human Genome Variation Society” a nie Human Genome Variant Server (str. 24).

Praca ta jest wyjątkowo interesująca, oryginalna i nowatorska i spełnia kryteria odpowiadające rozprawom na stopień doktora nauk medycznych. Niewątpliwie podjęty przez Doktorantkę temat wzbogaca wiedzę dotyczącą udziału czynników genetycznych w rozwoju poszczególnych form zaburzeń rozwoju płci. Wnosi także aspekt praktyczny poprzez propozycję schematu postępowania diagnostycznego w tych zaburzeniach z uwzględnieniem nowoczesnych metod analizy genomu. Przedstawiona rozprawa doktorska cechuje się odpowiednim doбором materiału badawczego oraz zastosowaniem właściwych i adekwatnych do celu pracy metod badawczych. Zwraca uwagę dokładna analiza wyników, krytyczny i dojrzały charakter prowadzonej dyskusji, oryginalność badań i prawidłowość wyciąganych wniosków co upoważnia do stwierdzenia, że Doktorantka jest przygotowana do planowania i prowadzenia badań naukowych. W chwili obecnej w badaniach genetycznych zaburzeń rozwoju płci wykorzystuje się niewielką liczbę genów, wybranych jako geny

kandydujące zaangażowane w patogenezę tego schorzenia. Jednak informacje o podłożu genetycznym w wielu przypadkach tych zaburzeń są niewystarczające. Wobec tego faktu szeroka i jednoczasowa analiza wielu czynników genetycznych dokonana przez Doktorantkę wraz z zaproponowanym algorytmem diagnostycznym jest szczególnie interesująca i wartościowa.

Podsumowując uważam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa stanowi bardzo ważny wkład do badań nad podłożem genetycznym zaburzeń rozwoju płci. Rozprawa spełnia warunki określone w obowiązującej Ustawie (art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym Dz. U. z 2016 r. poz. 882 oraz Dz.U. z 2017 r. poz. 859). **Zwracam się wobec tego do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego I Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu z wnioskiem o dopuszczenie lek. Zofii Kolesińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego i wyróżnienie przedłożonej rozprawy doktorskiej.**



Poznań, 23.10.2017

prof. dr hab. n. med. Katarzyna Ziemnicka

