

Prof. dr hab. n. med. Maria Giżewska
Klinika Pediatrii, Endokrynologii, Diabetologii,
Chorób Metabolicznych
i Kardiologii Wieku Rozwojowego
Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego
W Szczecinie

Szczecin, 29. 05. 2022

Recenzja

rozprawy doktorskiej lek. Mateusza Bieli

**pt. „Poszukiwanie nowych przyczyn chorób neurodegeneracyjnych u noworodków
i dzieci za pomocą technik sekwencjonowania następnej generacji”**

przygotowana na podstawie uchwały

Rady Dyscypliny Nauki Medyczne

**Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu nr 460/III/2022 podjętej
w dniu 24 marca 2022r.**

Rozprawa doktorska pana lek. Mateusza Bieli jest wynikiem badań nad molekularnym podłożem chorób neurodegeneracyjnych u dzieci. Autor podjął się analizy tego zagadnienia z uwagi na brak dostatecznej wiedzy zarówno o patomechanizmach tych schorzeń i ich heterogennym podłożu molekularnym, a także ze względu na złożoność aspektów klinicznych i diagnostycznych chorób neurorozwojowych, w tym neurodegeneracyjnych.

Znajomość przyczyny zaburzeń rozwojowych u ludzi pozwala określić rokowanie, zaplanować dalsze postępowanie diagnostyczne, terapeutyczne i rehabilitacyjne, umożliwia także zastosowanie odpowiedniej profilaktyki chorób współistniejących. Są to aspekty szczególnie ważne w odniesieniu do populacji pediatrycznej, w której wczesna, odpowiednio dobrana do indywidualnych potrzeb małego pacjenta interwencja diagnostyczno-terapeutyczna może znacząco zmienić życie chorego dziecka. Właściwe rozpoznanie ma także istotne znaczenie dla poradnictwa rodzinnego. Poznawanie przyczyn zaburzeń rozwojowych u ludzi ma także wymiar naukowy – pozwala lepiej poznać patogenezę chorób i potencjalnie stwarza możliwość leczenia czy zapobiegania schorzeniom w przyszłości. Wiele z tych często mało znanych jednostek chorobowych, dotyczy pacjentów ze złożoną i skomplikowaną historią i określane jest mianem chorób rzadkich. Choroba rzadka, zwana inaczej chorobą sierocą (*orphan disorder*), oznacza jednostkę chorobową, która występuje w populacji z częstością mniejszą, niż 1 na 2000 osób. Część z tych chorób należy wręcz do schorzeń ultrarzadkich występujących rzadziej, niż 1 na 50 000 urodzeń, niektóre bywają opisane zaledwie w pojedynczych rodzinach na świecie. Zdefiniowano blisko 8 tys. chorób rzadkich

i lista ta jest stale poszerzana. Jest więcej niż pewne, iż każdy lekarz, bez względu na realizowaną specjalizację, spotka na swojej drodze zawodowej pacjenta, często dziecko, dotknięte jedną z chorób rzadkich. W populacji pediatrycznej przebieg chorób rzadkich jest często ciężki. W połowie przypadków pierwsze objawy można wykazać już w okresie prenatalnym lub wczesnodziecięcym, 70% chorób rzadkich ujawnia się przed 2 rokiem życia. W pierwszym roku życia są one przyczyną zgonów aż 35% dzieci.

Do grupy chorób rzadkich należą choroby neurodegeneracyjne, czyli grupa wrodzonych lub nabytych schorzeń układu nerwowego objawiających się postępującym uszkodzeniem komórek nerwowych. Przykładem chorób neurodegeneracyjnych są, zaliczane do wrodzonych wad metabolizmu, choroby neurometaboliczne, które mogą odpowiadać za postępujące, często gwałtownie, pogorszenie stanu neurologicznego dzieci.

Pomimo intensywnego rozwoju zaawansowanych technik badawczych, u ponad 50% pacjentów z postępującymi objawami neurologicznymi etiologia objawów jest nadal nieznana. Przypuszcza się, że główną rolę w patomechanizmie tych schorzeń pełnią nie do końca jeszcze poznane czynniki genetyczne. Chociaż w odniesieniu do większości chorób uwarunkowanych genetycznie nadal nie ma możliwości skutecznego leczenia, wraz z podstępem medycyny pojawiają się nowe metody terapeutyczne, których skuteczność jest tym większa, im szybciej (optymalnie jeszcze w okresie przedobjawowym) zostaną one wprowadzone. Stąd nie do przecenienia są wszelkie wysiłki zmierzające do wprowadzenia nowoczesnych metod wczesnej identyfikacji pacjentów, w tym chorych dzieci, a w szczególności noworodków, u których przebieg tych chorób może być bardzo dynamiczny, wręcz „piorunujący”. Możliwość szybkiej, precyzyjnej i ostatecznej diagnozy chorób rzadkich skraca także często wieloletnią „odyseję diagnostyczną”, która jest udziałem chorego dziecka i całej jego rodziny.

W tym aspekcie wybór problematyki naukowej podjętej przez Doktoranta jest niezwykle trafny. Doktorant podjął się wprowadzenia metody NGS, czyli sekwencjonowania nowej generacji do wczesnej identyfikacji zmian genetycznych u dzieci, w tym noworodków i niemowląt z podejrzeniem choroby neurodegeneracyjnej o ciężkim przebiegu. Badanie NGS jest wysokoprzepustową metodą sekwencjonowania pozwalającą na sekwencjonowanie milionów cząstek DNA jednocześnie. Zrewolucjonizowało ono badania nad genomem człowieka oraz przyczyniło się do ogromnego postępu w dziedzinie genetyki medycznej. Metoda ta ma kilka opcji, wybraną przez Doktoranta było sekwencjonowanie całego eksomu (części kodującej genomu), czyli badanie metodą WES (ang. whole-exome sequencing). Był to z wielu względów optymalny wybór metody badawczej, ponieważ większość (około 85%) wariantów genetycznych odpowiedzialnych za choroby o podłożu genetycznym zlokalizowanych jest w eksonach lub w ich bliskim sąsiedztwie.

Dorobek naukowy doktoranta:

Doktorant, młody lekarz i naukowiec, już na tak wczesnym etapie swojego rozwoju imponuje znaczącym dorobkiem naukowym.

Jak wynika z analizy publikacyjnej z Załącznika 11.1, dorobek naukowy Doktoranta obejmował publikacje i doniesienia zjazdowe z różnych dziedzin medycyny, przede wszystkim z szeroko pojętej genetyki człowieka, chorób zakaźnych dzieci i medycyny sportu, w tym medycyny górskiej. Zgodnie z informacjami z w/w załącznika, na dzień zgłoszenia rozprawy doktorskiej Doktorant był autorem i współautorem 10 publikacji z IF, w tym 2 prac z pierwszym autorstwem o łącznej wartości 840 pkt MNiSW, a także 6 publikacji bez IF o wartości 137 pkt MNiSW, w tym 3 prac z pierwszym autorstwem oraz 13 doniesień zjazdowych. Sumaryczny IF Doktoranta wynosił 34,824, co stanowiło łącznie 977,0 pkt. MNiSW. Sumaryczny IF 3 publikacji składających się na rozprawę doktorską wynosi 10,520. Z pogłębionej, aktualnej analizy dorobku Doktoranta z bazy PubMed oraz bazy Biblioteki Głównej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu wynika, że doktorant opublikował kolejną pracę z IF z pierwszym autorstwem oraz 2 publikacje bez IF, co daje sumaryczny IF 38,921 i 1077 pkt. MNiSW, h-indeks 3 wg. bazy Scopus. Nie często jest okazja recenzowania rozprawy doktorskiej, w której dorobek naukowy autora wynosi ponad 30 pkt. IF, a wręcz zbliża się do 40, z ponad 1000 punktów MNiSW. Według mojej oceny prezentowany dorobek Doktoranta jest imponujący i bardzo dobrze rokuje co do dalszej kariery naukową autora dysertacji.

Ocena pracy doktorskiej:

Ocena pracy doktorskiej obejmowała ocenę merytoryczną i metodologiczną oraz podsumowanie i wnioski końcowe.

Projekt badawczy pt. *“Searching for new causes of severe progressing neurometabolic diseases in newborns and infants hospitalized in intensive care units by application of rapid whole exome sequencing”*, będący podstawą ocenianej rozprawy doktorskiej, był projektem naukowym dla doktorantów realizowanym ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego w Programie “Regionalna Inicjatywa Doskonałości” i prowadzonym pod kierownictwem promotora – prof. dr hab. n, med. Roberta Śmigła.

Jak wspomniano wcześniej, rozprawa doktorska pana Mateusza Bieli została skonstruowana na podstawie trzech publikacji ze znaczącym sumarycznym IF 10,520 pkt.

Przedstawiona do recenzji praca obejmuje 97 strony z podziałem na wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską, streszczenie w języku polskim i angielskim, omówienie cyklu publikacji wraz z wprowadzeniem, metodologią, dyskusją i wnioskami, kopie publikacji, piśmiennictwo, dorobek naukowy Doktoranta i oświadczenia współautorów publikacji.

Omówienie cyklu publikacji Doktoranta będących podstawą dysertacji zaczyna się bardzo merytorycznym, ciekawie napisanym wprowadzeniem. Ta część pracy stanowi skrótowe, ale rzetelne omówienie zagadnień związanych z patogenezą, przebiegiem klinicznym i trudnościami diagnostycznymi chorób rzadkich, w szczególności chorób neurodegeneracyjnych. Została opracowana w oparciu o szeroką i aktualną literaturę i pozwala czytelnikowi na zapoznanie się z problemami, na których Doktorant skupia się w swojej pracy badawczej. Przedstawiona wnikliwa analiza aktualnej literatury nie pozostawia wątpliwości, że decyzja Doktoranta o kierunku prowadzonych badań jest w pełni uzasadniona zakresem obecnej wiedzy, zarówno z naukowego, jak i klinicznego punktu widzenia.

Cele i założenia rozprawy doktorskiej pana lek. Mateusza Bieli zostały sformułowane szeroko i ambitnie, co potwierdza dojrzałość naukową Doktoranta. Głównym założeniem Doktoranta była identyfikacja zmian genetycznych skutkujących wadami neurorozwojowymi u człowieka, w tym w szczególności:

1. identyfikacja nowych czynników genetycznych w etiologii gwałtownie postępujących chorób neurodegeneracyjnych przy wykorzystaniu technologii badań genomowych uwzględniających badanie rapid-WES;
2. próba określenia związku między wariantem pojedynczego nukleotydu a wynikiem klinicznym (korelacja genotyp-fenotyp);
3. opracowanie algorytmu diagnostycznego u noworodków i niemowląt z ciężkimi i szybko postępującymi zaburzeniami neurodegeneracyjnymi w Oddziałach Intensywnej Terapii Noworodków i Dzieci z zastosowaniem badania rapid-WES;

W części pt Metody Doktorant szczegółowo przedstawił kryteria włączenia i wyłączenia do badania oraz zasady kwalifikacji do badania mikromacierzy i badania rapid-WES. Autor dysertacji wyczerpująco przedstawił metodykę badania WES z uwzględnieniem badań rodzinnych wariantów rozważanych, jako potencjalnie sprawcze.

Do badania WES zakwalifikowano 57 pacjentów z wybranych miast Polski, którzy przebywali na oddziałach intensywnej terapii dla noworodków lub dzieci, u których wystąpiło nagle pogorszenie stanu neurologicznego o postępującym przebiegu bez ustalonej przyczyny i u których podejrzewano chorobę uwarunkowaną genetycznie. Od zakwalifikowanych pacjentów i ich rodziców pobierano krew na EDTA. Badania WES przeprowadzono w Zakładzie Genetyki Medycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Najmłodszy zakwalifikowany pacjent był 1-dniowym noworodkiem, najstarszy miał 3 lata i 7 miesięcy. Była to grupa ekstremalnie chorych dzieci, ze wskaźnikiem śmiertelności 45,6% (26/57). Średni czas oczekiwania na wynik rapid-WES był imponująco krótki i wynosił 14 dni (bez weryfikacji wariantów u rodziców).

Spośród ww. 57 pacjentów, u 41 (71,9%) po wykonaniu badania WES postawiono ostateczną diagnozę. U pozostałych dzieci nie znaleziono wariantów patogennych bądź potencjalnie patogennych w eksomie, co z dużym prawdopodobieństwem wykluczyło podłoże monogenowe choroby. Zidentyfikowano mutacje w 35 genach. 32 z 35 zidentyfikowanych wariantów zostało już wcześniej opisanych w literaturze, jako warianty patogene lub prawdopodobnie patogene. U trójki dzieci zidentyfikowano warianty w genach, których funkcje były wcześniej znane, ale nie powiązano ich dotychczas z żadną chorobą u człowieka. Były to geny *DCAF5*, *NARS1* i *NFASC*.

Zasadniczą część pracy doktorskiej jest analizą trzech publikacji.

W pierwszej z nich, pt. *Rapid whole-exome sequencing as a diagnostic tool in a neonatal/pediatric intensive care unit* opublikowanej w *Journal of Clinical Medicine* (2020, IF 4,241) przedstawiono wyniki badania WES u 18 dzieci z oddziałów intensywnej terapii dla noworodków i dzieci. Diagnozę molekularną udało się postawić u 13 z 18 pacjentów, co odpowiada wskaźnikowi diagnostycznemu na poziomie 72,2%. Część dzieci kwalifikowana była do badania WES już po wcześniejszych, nieskutecznych diagnostycznie procedurach badawczych. U tych, dla których analiza WES wykonywana była jako pierwsze badanie w kierunku chorób genetycznych, wskaźnik diagnostyczny był bardzo wysoki i wynosił 88,9%. Warto zauważyć, że u ponad połowy chorych przyczyną ciężkiego stanu dzieci były wrodzone wady metabolizmu, w tym choroby mitochondrialne (zespół Leigha), co jest bardzo ważną informacją dla lekarzy, w tym specjalistów pediatrii metabolicznej, konsultujących krytycznie chore dzieci z oddziałów intensywnej terapii. U dwójki dzieci zidentyfikowano mutacje w genach, których funkcje były wcześniej znane, ale nie powiązano ich dotychczas z żadną chorobą człowieka: *DCAF5* i *NARS1*. W podsumowaniu wyników tej pracy Doktorant słusznie zauważył, że dla pacjenta w ciężkim stanie, którego etiologia objawów jest nieznana, postawienie diagnozy molekularnej może mieć fundamentalne znaczenie kliniczne i wpływać na dalsze postępowanie. Praca wykazała, że rapid-WES jest efektywnym i istotnie przyspieszającym diagnostykę narzędziem molekularnym u noworodków i dzieci przebywających na oddziałach intensywnej terapii, które mają ciężkie i zróżnicowane objawy wskazujące na chorobę neurodegeneracyjną.

W drugiej z cyklu doktorskiego publikacji pt. *Variants of ATP1A3 in residue 756 cause a separate phenotype of relapsing encephalopathy with cerebellar ataxia (RECA) - report of two cases and literature review* (*Molecular Genetics & Genomic Medicine* 2021, IF 2,183) przedstawiono korelację genotypowo-fenotypową chorych z mutacją w pozycji 756 genu *ATP1A3*. W artykule opisano dwójkę dzieci z wariantem c.2267G>A (p. Arg756His) w *ATP1A3* oraz dokonano przeglądu literatury podkreślając złożoność symptomatologii klinicznej pacjentów z mutacjami w omawianym genie. Analiza danych literaturowych i dokładna ocena kliniczna chorych własnych pozwoliły dodatkowo ustalić użyteczność akronimu RECA w opisie zarówno objawów ostrych dekomensacji neurologicznej, jak i długotrwałych następstw tej ultra rzadkiej choroby.

Trzecia publikacja w prezentowanym cyklu, to artykuł pt.: *Further delineation of developmental delay with gastrointestinal, cardiovascular, genitourinary, and skeletal abnormalities caused by ZNF699 gene mutation* (Genes 2022, IF 4,096). W pracy przedstawiono pacjenta z mutacją w genie *ZNF699*, odpowiedzialnym za chorobę opisywaną akronimem DEGCAGS syndrome (ang. Developmental Delay with Gastrointestinal, Cardiovascular, Genitourinary, and Skeletal Abnormalities). Dokonując tego opisu, Doktorant po raz kolejny konfrontuje się z problematyką chorób ultraradkich. Publikacja jest bowiem dopiero drugą pracą opisującą korelację genotypowo-fenotypową pacjentów z mutacją w genie *ZNF699* i pierwszą na świecie publikacją, w której użyto ww. akronimu, a także przeanalizowano dokładnie symptomatologię zespołu. Opisany proband jest czternastym opisanym pacjentem ze stwierdzonym wariantem patogennym w genie *ZNF699*.

W Dyskusji Doktorant w sposób bardzo dojrzały odnosi się do uzyskanych wyników badań. W tej części pracy znajdują się też bardzo ciekawe z klinicznego punktu widzenia opisy pacjentów z mutacjami w genach *NARS1*, *DCAF5*, *NFASC* i *TRMT10C*. Pacjent z mutacją w genie *NARS1* w chwili rozpoznania był prawdopodobnie pierwszym na świecie przypadkiem z mutacją w tym genie rozpoznany przyżyciowo. W większości, zaburzenia w aktywności syntetaz aminoacyl-RNA kodowanych przez geny z grupy ARS, w tym także *NARS1*, prowadzą do ostrych i postępujących chorób układu nerwowego, najczęściej o letalnym przebiegu. Podobnie ciekawie przedstawiają się opisy pacjentów z mutacjami w pozostałych z w/w genów. Doktorant podkreślił także znaczny, bo wynoszący aż 12,3%, udział w grupie wszystkich diagnoz molekularnych rozpoznań zespołu Leigha, czyli ciężkiej wrodzonej wady metabolizmu z grupy cytopatii mitochondrialnych. Zwrócił tym samym ponownie uwagę na możliwość metabolicznego podłoża ciężkich stanów wśród dzieci hospitalizowanych w oddziałach intensywnej terapii. Forma przedstawienia historii chorób zdiagnozowanych pacjentów, próba wytłumaczenia patogenezы obserwowanych objawów w połączeniu z wyjątkową umiejętnością czerpania wiedzy z najnowszego piśmiennictwa, współdziałanie w opracowaniu długoterminowych strategii postępowania, wszystko to świadczy o imponującym doświadczeniu klinicznym i genetycznym Doktoranta. Dyskusja kończy się opracowaniem niezwykle ważnego z praktycznego punktu widzenia algorytmu diagnostycznego dla lekarzy pracujących na oddziałach noworodkowych i niemowlęcych, u których podejrzewa się chorobę neurodegeneracyjną. Zakłada on szeroką i wielopłaszczyznową diagnostykę uwzględniającą choroby o podłożu genetycznym.

Na podstawie przeprowadzonych badań i dociekań naukowych Doktorant udowodnił, że rapid-WES jest skutecznym i skracającym czas diagnostyki badaniem u noworodków i dzieci przebywających w oddziałach intensywnej terapii, u których występują niejednorodne i ciężkie objawy choroby neurodegeneracyjnej. Praca Doktoranta udowadnia, że szybkie ustalenie ostatecznej diagnozy, w tym z zastosowaniem najnowocześniejszych metod diagnostyki molekularnej, pozwala na wprowadzenie

optymalnego, indywidualnego postępowania, udzielenie porady genetycznej oraz objęcie chorego dziecka i jego rodziny wielokierunkową opieką.

Należy zwrócić uwagę na bardzo nowoczesne ujęcie przez Doktoranta trudnego tematu diagnostyki chorób rzadkich i ultraradkich w grupie dzieci z objawami ostrych i postępujących schorzeń neurodegeneracyjnych. Pan lek. Michał Biela wykazał się dużą dojrzałością naukową i szeroką wiedzą z zakresu pediatrii, w tym pediatrii metabolicznej, neurologii dziecięcej, genetyki molekularnej i genetycznej diagnostyki laboratoryjnej oraz biochemii. Jest osobą o dużych zdolnościach organizacyjnych - zorganizował efektywną współpracę wielu ośrodków klinicznych. Charakteryzuje się także dużą umiejętnością pisania wartościowych, ważnych z poznawczego i klinicznego punktu widzenia prac naukowych, a zebrany materiał z pewnością będzie źródłem niejednej jeszcze publikacji. Co najważniejsze, doskonała dysertacja Doktoranta ma ogromne znaczenie praktyczne, już przyczyniła się do ustalenia ostatecznych rozpoznań ciężkich schorzeń neurorozwojowych u wielu dzieci, u części z nich możliwa była zmiana postępowania diagnostyczno-terapeutycznego. Było to szczególnie ważne w odniesieniu do pacjentów, u których dokonano korzystnej modyfikacji przebiegu choroby. W przyszłości praca ta będzie na pewno ważnym źródłem praktycznych informacji dla lekarzy wielu specjalności zajmujących się chorymi dziećmi.

W podsumowaniu pragnę podkreślić, że praca doktorska lek. Mateusza Bieli stanowi rzeczywisty wkład w rozwój wiedzy w zakresie poruszanych zagadnień. Rozprawa została również bardzo starannie przygotowana pod względem redakcyjnym, napisana bardzo poprawną polszczyzną. Znalazłam jedynie kilka błędów interpunkcyjnych, stylistycznych czy ogólnie redakcyjnych, co oczywiście nie umniejsza wartości naukowej tej pracy.

W mojej ocenie rozprawa doktorska lek. Mateusza Bieli spełnia wymogi, stawiane tego typu rozprawom określone w art.13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.). W związku z tym zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki Medycznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu im. Piastów Śląskich o dopuszczenie lek. Mateusza Bieli do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Medycznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu im. Piastów Śląskich o wyróżnienie nagrodą dysertacji doktorskiej lek. Mateusza Bieli.

Suzeciu 28.05.2022

Maria Giżewska

prof. dr hab. med. MARIA GIŻEWSKA
specjalista chorób dzieci
i pediatrii metabolicznej
tel. 601 536 777
7453284