

Ocena rozprawy doktorskiej lekarz Karoliny Matuszewskiej
pt. „Aberracje chromosomowe i rearanżacje genomowe u zarodka
i płodu jako przyczyna utraty ciąży – badania metodą QF-PCR
i mikromacierzy CGH”

Prawidłowy przebieg ciąży jest dążeniem wszystkich ginekologów i położników. Jednak aż 10-70% ciąż, zależnie od etapu ich rozwoju, kończy się poronieniem samoistnym. Główną przyczyną poronień są nieprawidłowości genomu płodu, głównie niedziedziczne, oraz w części przypadków odziedziczone po rodzicach – nosicielach zrównoważonych aberracji chromosomowych lub recesywnych mutacji genowych. Poznanie genetycznych przyczyn poronień nie tylko poszerza naszą wiedzę na ten temat, ale pomaga również w zastosowaniu adekwatnej profilaktyki lub postępowania terapeutycznego.

Znakomitym narzędziem do poznania genetycznego podłoża poronień samoistnych okazały się nowoczesne metody badań cytogenetyczno-molekularnych. W pierwszej kolejności była to porównawcza hybrydyzacja genomowa do mikromacierzy (aCGH), metoda będąca na Zachodzie badaniem pierwszego rzutu genetycznej diagnostyki przed- i pourodzeniowej, a w Polsce, ze względu na koszt badań, nie objęta refundacją NFZ. Drugą metodą analizowaną w recenzowanej pracy jest QF-PCR, pozwalająca na ocenę liczbowych aberracji chromosomów.

Celami przedstawionej mi do oceny pracy doktorskiej pani Karoliny Matuszewskiej było określenie udziału dużych oraz submikroskopowych aberracji i rearanżacji genomowych u zarodka/płodu w etiologii poronień, ustalenie częstości powtarzania się ich w kolejnych ciążach u par z poronieniami nawracającymi oraz ich częstości u par z nosicielstwem aberracji zrównoważonych. Odrębnym celem było poszukiwanie zlokalizowanych w regionach rearanżacji genów, które mogłyby być genami kandydującymi jednogennych przyczyn poronień. Praktycznym celem pracy było zaproponowanie uwzględniającego badanie materiału z poronienia algorytmu genetycznego postępowania diagnostycznego u par z poronieniami nawracającymi. Przedstawione wyżej cele zostały osiągnięte.

Rozprawa podsumowująca badania Doktorantki pisana jest dobrą polszczyzną z dość nielicznymi literówkami, ilustrowana przejrzystymi tabelami i rycinami. Piśmiennictwo zawiera 140 pozycji, głównie z ostatnich 5-10 lat, obejmujących cały przekrój zagadnień przedstawionych w pracy. Znalazło się w nim wiele stale aktualnych prac, przedstawiające różnorodne genetyczne przyczyny poronień, ale też między innymi kontrowersyjna praca z 2000r. o związku ryzyka urodzenia dziecka z zespołem Downa z polimorfizmem *MTHFR*. Dane bibliograficzne przedstawione zostały w sposób bardzo uporządkowany. Cennym uzupełnieniem rozprawy, ułatwiającym zadanie recenzenta, jest zamieszczony na początku skromny, lecz wystarczający „Wykaz stosowanych skrótów”. Na końcu rozprawy Doktorantka umieściła suplement zawierający m.in. zgodę Komisji Bioetycznej, kartę zlecenia wykonania badania genetycznego materiału z poronienia i deklarację zgody pacjentów, świetne przykłady kart informacyjnych dla par z poronieniami oraz bogatą tabelę z charakterystyką demograficzną i kliniczną par z poronieniami.

W dwudziestostronicowym wstępie pracy Doktorantka przedstawiła różnorodne przyczyny poronień, genetyczne i niegenetyczne, oraz opisała krytycznie metody badań, których wyniki analizowała w pracy.

Metodą badawczą, przyjętą przez Doktorantkę była retrospektywna analiza wyników cytogenetyczno-molekularnych badań kosmówek w kontekście danych demograficznych, laboratoryjnych i klinicznych par z poronieniami oraz analiza statystyczna uzyskanych danych. „Część laboratoryjna badań została wykonana przez zespół biologów molekularnych i diagnostów laboratoryjnych w Laboratorium Biologii Molekularnej CGM Genesis w Poznaniu”. Doktorantka, będąc tylko lekarzem genetykiem klinicznym, nie wykonywała samodzielnie żadnych badań laboratoryjnych, choć sposób ich opisu i analizy wyników świadczy o przynajmniej teoretycznej, rozległej wiedzy nt. metodyki badań genetycznych analizowanych w pracy. Natomiast wszyscy pacjenci byli osobiście konsultowani przez lek. Karolinę Matuszewską w poradni genetycznej, wszyscy otrzymali rzetelnie napisane karty informacyjne.

Doktorantka przeanalizowała łącznie wyniki badań genetycznych olbrzymiej grupy 1244 kosmówek po poronieniu, otrzymanych od 1193 pacjentek. Wśród nich 317 wyników stanowiły wyniki aCGH, a 827 – wyniki badań QF-PCR. Analizując wyniki aCGH stwierdziła, że w większości przypadków były to trisomie (58.5%), rzadziej monosomia X i rearanżacje/aberracje strukturalne. Najczęstszą trisomią była

ef

trisomia chromosomu 16, praktycznie nie spotykana u żywo urodzonych dzieci. W 9.3% przypadków stwierdzono triploidię, o której Doktorantka we „Wstępie” pisała, że ograniczeniem metody aCGH jest brak możliwości identyfikacji wybranych poliploidii, np. triploidii. Czym wobec tego można wytłumaczyć taką rozbieżność między tekstem „Wstępu” i „Wyników” ?

Strukturalne aberracje chromosomów i rearanżacje genomowe stwierdzono w 32 kosmówkach (7.7%). Wyniki badań aCGH kosmówek od pacjentek ze zrównoważonymi aberracjami strukturalnymi zestawiała Autorka, w miarę możliwości, z obrazami chromosomów wybarwionych w technice GTG. Skąd się wzięły te chromosomy, jeśli w opisie metodyki Autorka nie wspomina o tej technice? I tylko w jednym przypadku pisze, że „badanie było wykonane w innym ośrodku”.

Najczęstszą rearanżacją genomową była zmiana w regionie 3p21, stwierdzona w 6 kosmówkach. W pięciu była to mikrodelecja, w jednej mikroduplikacja.

W ciekawych i zawierających dużo informacji tabelach 11 i 12 Doktorantka przedstawiła znalezione rearanżacje, ich dokładną lokalizację genomową, charakterystykę genów zawartych w zmienionych fragmentach chromosomów i zmiany fenotypowe wynikające z tych rearanżacji.

Ciekawymi obserwacjami Autorki były, że w miarę starzenia się kobiet występowało w poronieniach coraz więcej trisomii i coraz mniej aberracji strukturalnych oraz że wraz ze zwiększeniem liczby poronień u danej pary, maleje w nich udział czynników genetycznych (odsetek wyników nieprawidłowych). Ponadto Doktorantka stwierdziła, że im późniejszy był tydzień utraty ciąży, tym częściej w kosmówce występowały trisomie 13, 18, 21, zamiast innych aberracji liczbowych i strukturalnych. Stwierdziła też, że jeśli jedno z partnerów było nosicielem zrównoważonej aberracji strukturalnej, to aberracje strukturalne w kosmówkach występowały znacznie częściej, niż u par bez takiego nosicielstwa.

Doktorantka badała też częstość występowania aberracji w zależności od sposobu „uzyskania” ciąży i udowodniła, że nie ma żadnych statystycznie istotnych różnic w tym zakresie. Jednak największy odsetek nieprawidłowych wyników stwierdzono w kosmówkach z ciąż uzyskanych metodą inseminacji nasieniem partnera, co jest wynikiem zaskakującym.

W badaniu QF-PCR zdecydowanie najczęstsze były trisomie (69.6%), dużo rzadziej występowały triploidie (15.2%) i monosomia X (13.4%). W badaniach tych

ef

interesującym, podobnym do tego w aCGH spostrzeżeniem było, że im późniejszy tydzień utraty ciąży, tym częstsze trisomie 13, 18, 21 w stosunku do innych trisomii (15, 16, 22). Ponadto – przeciwnie niż w badaniu aCGH – większy odsetek trisomii w kosmówce odnotowano u par bez nosicielstwa aberracji niż z nimi. Natomiast największy odsetek wyników nieprawidłowych, podobnie jak w aCGH, stwierdzono w kosmówkach z ciąży uzyskanych w wyniku inseminacji nasieniem partnera.

Analiza wyników zarówno aCGH, jak i QF-PCR w materiale z kolejnych poronień wykazała, że jeśli w pierwszym poronieniu nie było aberracji, w kolejnym nieprawidłowy wynik badania kariotypu kosmówki był częstszy niż w kolejnych ciążach po ciąży z aberracjami. Bardzo interesująca jest tabela 24 przedstawiająca wyniki badania kariotypu kosmówki u wszystkich kobiet z powtarzającymi się poronieniami, u których te wyniki udało się uzyskać; u trzech kobiet stwierdzono powtarzającą się trisomię, w tym u dwóch chromosomu 15, u jednej chromosomu 16, a u jednej powtarzającą się aberrację strukturalną wynikającą z nosicielstwa przez tę kobietę aberracji zrównoważonej.

U kobiet z polimorfizmem typu Leiden czynnika V krzepnięcia nieznamienne częściej stwierdzano aberracje w kosmówce. Polimorfizmów innych genów związanych z trombofilią nie analizowano.

Przydatność i czułość analizowanych metod badań (np. w zakresie wykrywania triploidii) oraz ich wyniki Doktorantka dokładnie i krytycznie przedyskutowała. Przeanalizowała także częstość występowania trisomii i jej zależność od wieku partnerów. Zabrakło mi w dyskusji wyjaśnienia występowania w materiale z poronień trisomii 16 jako najczęstszej aberracji. Ale pewnie nikt, nie tylko Doktorantka, nie wie, jaka jest tego przyczyna.

W odniesieniu do powtarzających się w kolejnych dwóch ciążach takiej samej aberracji, Doktorantka zacytowała Robinsona i wsp., twierdzących że powtarzanie się tej samej trisomii nie świadczy jeszcze o mozaikowości gonadalnej. Dwukrotne powtórzenie może nie, ale trzykrotne?

Doktorantka zwróciła uwagę na powtarzającą się rearanżację regionu 3p21. W regionie tym leży gen *DAG1*, który może mieć powiązania z procesem implantacji przebudową łożyska na wczesnym etapie ciąży. Doktorantka zwróciła uwagę, że nieprzypadkowe wystąpienie zmian w tym regionie (aż sześciokrotnie) otwiera nowy, interesujący kierunek badań.

ok

Sposób prowadzenia dyskusji świadczy o dużej samodzielności Doktorantki w myśleniu, krytycznym spojrzeniu na wyniki własnych badań i dojrzałości naukowej. Dyskusja jest bardzo interesująca. Jej zwieńczeniem jest zaproponowanie nowego algorytmu badań genetycznych u osób z poronieniami, w którym punktem wyjścia jest badanie kosmówki metodą aCGH.

Najistotniejsze spostrzeżenia dokonane podczas realizacji pracy Doktorantka zawarła w 5 dobrze sformułowanych wnioskach, z których ostatni stanowi niejako rekomendację zaproponowanego algorytmu diagnostycznego.

Podsumowując, stwierdzam, że praca „Aberracje chromosomowe i rearanżacje genomowe u zarodka i płodu jako przyczyna utraty ciąży – badania metodą QF-PCR i mikromacierzy CGH” spełnia kryteria rozprawy naukowej na tytuł doktora nauk medycznych i mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Wydziału Lekarskiego I Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu wniosek o dopuszczenie lekarz Karoliny Matuszewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę szeroki zakres pracy oraz olbrzymie poznawcze i praktyczne znaczenie jej wyników, wnioskuję o jej wyróżnienie.

Bydgoszcz, 03.04. 2019 r.

KIEŁOWNIK
Katedry i Zakładu Genetyki Klinicznej
Olga Haus
prof. dr hab. Olga Haus