

Warszawa, 23.08.2017

Prof. dr hab. med. Rafał Płoski

Zakład Genetyki Medycznej

Warszawski Uniwersytet Medyczny

Recenzja

rozprawy na stopień naukowy doktora

mgr Filipa Ambrożkiewicza

pt. „Analiza porównawcza zmienności genetycznej

nieswoistych zapaleń jelit u dzieci i dorosłych w Polsce”

Tematem przedłożonej pracy jest istotne zagadnienie predyspozycji genetycznej do nieswoistych zapaleń jelit (NZJ) - wrzodziejącego zapalenie jelita grubego (WZJG) i choroby Leśniowskiego-Crohna (CLC) ze szczególnym uwzględnieniem stosunkowo słabo poznanych różnic między postaciami choroby u dzieci i dorosłych.

Badania zostały przeprowadzone na dużej grupie osób: 1495 chorych na NZJ (761 chorych na CLC i 734 chorych na WZJG) oraz grupie 934 osób zdrowych. 1165 chorych oraz 724 osoby zdrowe zostały objęte badaniem mikromacierzowym, w którym analizowano bardzo dużą (~2,5 mln) liczbę polimorfizmów, spełniając tym samym światowe standardy badań predyspozycji genetycznej do chorób wieloczynnikowych. Ciekawą modyfikacją wykonanych badań mikromacierzowych było pulowanie materiału pozwalające istotnie zmniejszyć koszt badań. Należy podkreślić, że strategia pulowania wymaga szczególnie starannego pomiaru ilości i jakości DNA, co bywa trudne w praktyce, szczególnie przy badaniu wielu próbek.

Cała badana grupa zawierała 814 osób, u których rozpoznano chorobę przed 17 rż. Grupa pacjentów objęta badaniem mikromacierzowym zawierała 667 takich osób, co jest istotne dla realizacji celu pracy, tj. analiz odrębności genetycznych związanych z wczesnym zachorowaniem.

Wszystkie osoby z ww. grupy 1495 chorych oraz 934 zdrowych były następnie badane w zakresie wybranych wariantów niezależną metodą (TaqMan) pozwalającą na analizę indywidualnych (nie pulowanych) próbek. Z 83 wariantów poddanych weryfikacji metodą TaqMan, 31 osiągnęło formalny poziom istotności statystycznej, a 52 - nominalny. W pracy wykazano, że 22 z badanych wariantów wykazało asocjacje z chorobą u dzieci oraz dorosłych, 8 – w tylko grupie pediatrycznej, a jeden - tylko u dorosłych. Spośród 52 polimorfizmów powiązanych z chorobą na nominalnym poziomie istotności statystycznej, 11 asocjowało u dzieci i dorosłych, 20 – u dorosłych, a 21 – u dzieci. Badania po raz pierwszy wskazały wyraźne różnice w genetycznej architekturze NZJ między dziećmi a dorosłymi.

Badania zostały przeprowadzone rzetelniej a ich wyniki są unikatowe w Polsce i jednocześnie stanowią istotny wkład w światowe piśmiennictwo dot. patogenezy chorób NZJ.

Pomimo wysokiej oceny pracy podczas lektury nasuwają się pewne uwagi.

Główna uwaga to brak prezentacji wyników badań replikacyjnych po podziale na grupę, w której wykonano badania mikromacierzowe oraz grupę dodatkową. Opierając się na danych z sekcji 5.1 można przypuszczać, że w przypadku pacjentów liczebność grupy dodatkowej wynosiła $1495-594=901$, a w przypadku kontroli $934-724=210$ osób.

Najbardziej wartościowa replikacja wyników uzyskanych w badaniu mikromacierzowym to oczywiście ta uzyskana wyłącznie na próbkach, które nie były przedmiotem tych badań. Należy zaznaczyć, że Autor sam podkreśla we Wstępie (str. 14/15), że „...wyniki analiz mikromacierzowych powinny być poddawane analizom weryfikacyjnym na niezależnym zbiorze próbek.”

Kolejną uwagą jest także brak bezpośredniego porównania statystycznego rozkładu alleli/genotypów pomiędzy grupami u dzieci i dorosłych, co było głównym celem pracy.

Analiza statystyczna (sekcja 5.7) powinna zostać opisana bardziej szczegółowo. W szczególności nie jest jasne jaki konkretnie parametr uzyskany podczas analizy mikromacierzowej był analizowany. Czy parametr ten był uzyskany bezpośrednio od firmy, wykonującej analizy czy też był wyliczony w Pracowni Badań Wielkoskalowych Zakładu Genetyki Centrum Onkologii.

Sekcja 5.7 jest stosunkowo krótka podczas gdy informacje nt. metod analizy statystycznej znajdują się w innych częściach pracy. W sekcji „Analiza statystyczna” brak jest w szczególności informacji nt. przyjętej strategii korekty wielokrotnego testowania w badaniach replikacyjnych. Brak jest także informacji czy (i jak) oceniano czy rozkłady genotypów uzyskane podczas badań replikacyjnych były zgodne w równowagą Hardyego-Weinberga. Jest to przyjęty test weryfikujący m.in. jakość genotypowania.

W sekcji 3.3 poświęconej ogólnej klasyfikacji chorób autor wymienia choroby chromosomalne, choroby jednogenowe oraz choroby złożone, czyli wieloczynnikowe. Nie jest zaznaczone, że ta klasyfikacja dotyczy zasadniczo chorób uwarunkowanych genetycznie.

Autor zwraca uwagę we Wstępie (str. 14), że w badaniach asocjacyjnych należy „... uniknąć rozwarstwienia populacyjnego..” które „...może generować wyniki fałszywie pozytywne..” .

W pracy brak jest dyskusji tego problemu. W szczególności ciekawa byłaby analiza wyników SNPów badanych w części replikacyjnej w kierunku ukrytej struktury badanej populacji.

Praca pod względem struktury formalnej jest starannie dopracowana. Układ rozprawy i struktura jej podziału jest prawidłowa z wyodrębnieniem streszczenia w języku polskim i angielskim, wstępu, celu pracy, opisu materiałów i metod, wyników, dyskusji, podsumowania oraz wniosków oraz piśmiennictwa. Praca liczy 54 strony, zawiera 5 tabel, 3 ryciny, cytuje 99 pozycji piśmiennictwa. Uwagi dotyczące formalnego układu pracy to:

- 1) Tabele 2 - 4 są trudne do czytania ponieważ część tekstu jest pionie a część w poziomie.
- 2) Brak wykazu skrótów.
- 3) Brak informacji o pochodzeniu rycin (szczególnie ryciny 2, w której niejasny jest podpis GR1556)
- 4) Wnioski, w szczególności Wniosek 2 („Jednym z najsilniej asocjujących z chorobami zapalnymi jelit był polimorfizm rs1049526, zlokalizowany w genie BRD2.”) nie odpowiadają precyzyjnie celowi pracy („...poszukiwanie różnic podłoża genetycznego nieswoistych zapaleń jelit u dzieci i dorosłych”).

Podsumowując stwierdzam, że pomimo pewnych uwag, przedmiot przeprowadzonych badań, dobór metodyki, prezentacja wyników, charakter dyskusji oraz uzyskane wnioski w pełni odpowiadają kryteriom stawianym pracom doktorskim. Wobec powyższego stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określne w artykule 13 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.) i wnioskuję do
Wysokiej Rady Naukowej Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego
o dopuszczenie mgr. Filipa Ambrożkiewicza do dalszych etapów przewodu
doktorskiego

Warszawa, 23.08.2017

Prof. dr hab. Rafał Płoski

