



Warszawa 25.01.2022

dr hab. n. med. Beata Nowakowska, prof nadzw. IMiD
Zakład Genetyki Medycznej
Instytut Matki i Dziecka

Recenzja pracy doktorskiej

Mgr Anny Nykel pt. „**Wykorzystanie technologii digital PCR do detekcji aneuploidii u płodu – opracowanie i implementacja nowego narzędzia diagnostycznego**”.

Promotor: dr hab. n. med. Agnieszka Gach

Aneuploidie chromosomów 13, 18, 21 oraz X i Y odpowiadają za blisko 80% nieprawidłowości chromosomowych identyfikowanych w okresie prenatalnym. Dlatego też, wykluczenie lub potwierdzenie obecności aneuploidii tych chromosomów jest najczęstszym wskazaniem do diagnostyki inwazyjnej. Obecnie stosuje się kilka metod diagnostycznych do szybkiej detekcji najczęstszych aneuploidii, jednak jak każda z metod laboratoryjnych, mają one pewne, charakterystyczne dla każdej techniki ograniczenia.

Celem pracy mgr A. Nykel było opracowanie nowej metody – digital PCR - do szybkiej detekcji aneuploidii u płodu, określenie jej użyteczności jako narzędzia diagnostycznego oraz oceny dokładności tej techniki w przypadku kontaminacji materiału komórkami matczynymi. W porównaniu do szeroko stosowanej metody real-time PCR, digital PCR umożliwia bezwzględną ocenę liczby kopii fragmentów DNA.

Rozprawa doktorska została przygotowana na podstawie trzech wieloautorskich prac opublikowanych w latach 2019-2021 w czasopiśmie o wysokim łącznym stopniu oddziaływania (IF = 11,968) oraz wysokiej łącznej punktacji MNiSW (280). We wszystkich publikacjach mgr A. Nykel jest pierwszym autorem.

W pierwszej pracy z cyklu załączonych publikacji: "Chip-Based Digital PCR Approach Provides A Sensitive and Cost-Effective Single-Day Screening Tool for Common Fetal Aneuploidies-A Proof of Concept Study." *Int J Mol Sci.* (2019) opisane zostały wyniki opracowania oraz walidacji metody digital PCR do szybkiej detekcji najczęstszych aneuploidii. Grupę badaną stanowiły 133 ciężarne skierowane na diagnostykę inwazyjną z powodu podwyższonego ryzyka wystąpienia aneuploidii u płodu. Materiał do badań stanowiło DNA wyizolowane z płynu owodniowego lub komórek trofoblastu. Praca ta ma charakter wdrożeniowy i dokumentuje przydatność zastosowanej metody do założonego celu. W celu określenia najniższego stopnia mozaikowości, możliwego do wykrycia stosowaną metodą, wykonano rozcieńczenia materiału odpowiadające odpowiednio 5%, 10%, 30%, 50% i 70% mozaikowości. Eksperyment ten wykazał, że metoda skuteczna jest do identyfikacji trisomii chromosomu 21 i 18 pary na poziomie nie niższym niż 20% i dla chromosomu 13 pary na poziomie około 30%.

Druga publikacja z cyklu: "Clinical Validation of Novel Chip-Based Digital PCR Platform for Fetal Aneuploidies Screening." *Diagnostics (Basel)* (2021) prezentuje skuteczność kliniczną zastosowanej techniki digital PCR na większej grupie badanej. Badanie przeprowadzono na 382 próbkach DNA wyizolowanych z płynu owodniowego oraz 123 próbkach DNA wyizolowanych z komórek trofoblastu. Wyniki opisane w pracy wskazują, że dla badanej grupy 505 ciężarnych, czułość i specyficzność identyfikacji aneuploidii dla chromosomów 13, 21 i 18 pary wynosiły 100%.

Trzecia z cyklu publikacja: "The Influence of Maternal Cell Contamination on Fetal Aneuploidy Detection Using Chip-Based Digital PCR Testing." *Diagnostics (Basel)* (2021) ma charakter bardziej eksperymentalny. Celem badania było określenie dokładności zastosowanej metody w przypadku kontaminacji materiału płodowego komórkami matczynymi. W pierwszym etapie badania ponownie przeprowadzono serię rozcieńczeń, symulując kontaminację na różnym poziomie procentowym. Wyniki opisane w pracy wskazują, że metoda digital PCR umożliwia detekcję aneuploidii u płodu nawet podczas wysokiej kontaminacji materiałem matczynym. Dane te sugerują, że opracowany algorytm może być wystarczający do oceny ryzyka kontaminacji i nie wymaga dodatkowych testów co znacznie usprawnia procedurę diagnostyczną i obniża jej koszty.

Przedstawienie rozprawy doktorskiej w formie opublikowanych wyników badań, w recenzowanych czasopismach naukowych, ułatwia ale jednocześnie utrudnia przedstawienie własnej oceny. Recenzja może mieć bowiem jedynie charakter odniesienia się do opublikowanych rezultatów, a nie jak w przypadku klasycznej rozprawy doktorskiej gdzie ocenie podlega całość rozprawy, ze wszystkimi jej elementami od merytorycznych po edytorskie. W rozprawie obok załączonych publikacji znajduje się co prawda krótki wstęp, cele pracy, jak też dodatkowo każdej publikacji towarzyszy stosowne streszczenie. Niemniej przyjęta, ale oczywiście zgodna z obowiązującymi przepisami forma rozprawy doktorskiej, utrudnia indywidualną ocenę zarówno osiągniętych wyników jak i osobistego wkładu doktorantki w przygotowanie rozprawy, pomimo, że z załączonych oświadczeń współautorów każda z prac została wykonana przez mgr A. Nykel w 70%.

Praca ma charakter czysto wdrożeniowy i zabrakło mi w niej pewnej „naukowości”. Jako praktyk, zajmujący się diagnostyką prenatalną, chciałaby aby mgr A. Nykel bardziej przekonała mnie, że powinniśmy w naszym laboratorium stosować tę metodę zamiast obecnie używanych. Przydatne byłoby zobaczenie chociażby bezpośredniego porównania techniki dPCR do innych metod stosowanych do szybkiej detekcji aneuploidii. W jednej z prac (publikacja nr 3), jest co prawda odpowiednia tabela, prezentująca porównanie stosowanych metod, lecz są to jedynie dane literaturowe, które nie odzwierciedlają wyników uzyskanych w innej pracy doktorantki (np. % wykrytej mozaikowości w tabelce jest podany 5-15%, podczas gdy w publikacji nr 1 procent ten oceniony został na poziomie 20-30%). Wyniki były jedynie porównywane z metodą klasycznej oceny kariotypu, która oczywiście nie jest metodą szybkiej diagnostyki aneuploidii, dodatkowo poprzez długotrwałą hodowlę nie jest przydatna do określenia poziomu mozaicyzmu. Na podstawie przedstawionych danych, wydaje się, że jednak metoda FISH (która wykrywa mozaiki na poziomie 6%) powinna być jednak metodą z wyboru, tym bardziej że metoda ta może być również wykonana w ciągu kilku godzin (nie wymaga całonocnej hybrydyzacji). Kwestie te niewątpliwie pozostają do dyskusji i szkoda, że doktorantka się do nich nie odniosła.

Pierwsze doniesienia na temat wykorzystania techniki digital PCR zostały opublikowane w latach 90tych. Od tego czasu znajdywano coraz szersze zastosowania tej metody. W odniesieniu do diagnostyki prenatalnej, Fan i współautorzy (2007 i 2009 rok) jako pierwsi opisali przydatność tej metody w szybkiej detekcji aneuploidii. Dodatkowo Geng i współautorzy (2017) (dostępny jedynie abstrakt w języku angielskim) wykazali przydatność metody dPCR do identyfikacji aneuploidii w przypadku kontaminacji materiału komórkami matczynymi. Obecnie technika ta wykorzystywana jest głównie do detekcji aneuploidii w prenatalnych badaniach nieinwazyjnych.

Innowacyjne w pracy mgr A. Nykel było zastosowanie platformy QuantStudio 3D Digital PCR, a nie samej metody digital PCR. Żałuję, że platforma ta, oraz jej innowacyjność, nie zostały szerzej omówione w pracy.

Wymienione powyżej uwagi nie umniejszają jednak w istotnym stopniu recenzowanej dysertacji. Rozprawa napisana jest zgodnie z obowiązującymi zasadami a doktorantka niewątpliwie włożyła dużo pracy w zebranie materiału i wykonanie badań. Badany problem i otrzymane wyniki mają duże znaczenie praktyczne w rutynowej diagnostyce prenatalnej.

Na podstawie powyższej recenzji wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki o dopuszczenie mgr Anny Nykel do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dodatkowo, pomimo kilku krytycznych uwag, ale biorąc pod uwagę wysoki wskaźnik IF opublikowanych prac, wnioskuję również do Wysokiej Rady o przyznanie wyróżnienia.

INSTYTUT MATKI I DZIECKA
ZAKŁAD GENETYKI MEDYCZNEJ
Zespół Pracowni Cyfrowej Genetyki
PRACOWNIK
dr hab. n. med. Beata Nowakowska prof. nadzw. IMiD