



UNIwersytet Medyczny

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU

Wrocław 22.09.2023r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Michała Skulskiego pt.:
**„Analiza podłoża molekularnego przypadku nieznanej anemii hemolitycznej z
zastosowaniem wysoko sprawnych metod sekwencjonowania”.**

Anemie hemolityczne to grupa schorzeń charakteryzująca się wewnątrznaczyniowym rozpadem erytrocytów spowodowanym nieprawidłowościami ich budowy. Najczęściej występują membranopatie i enzymopatie, które charakteryzują się występowaniem zaburzeń w organizacji błony erytrocytarnej i deficytami enzymów. W części przypadków podłoże molekularne tego typu schorzeń jest znane, ale wciąż diagnozowane są ich nowe rodzaje.

Celem niniejszej pracy była próba określenia podłoża molekularnego anemii hemolitycznej o nieznanym podłożu genetycznym występującej u dwóch braci.

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska została przygotowana w formie monograficznej. Jest obszernym opracowaniem, na które składa się 126 stron, ponadto zawiera 19 tabel oraz 32 ryciny. Obejmuje wstęp, założenia i cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję oraz wnioski. Ponadto zawiera streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów, spis tabel i rycin oraz piśmiennictwo, które jest cytowane w porządku alfabetycznym i obejmuje 188 pozycji. Piśmiennictwo uwzględnia aktualne wytyczne, prace poglądowe oraz prace oryginalne. Autor rozprawy cytuje 23 aktualnych artykułów z lat 2020-2023.

Wstęp rozprawy doktorskiej obejmuje 20 stron. Autor opisuje dokładnie przebieg erytropoezy, dojrzewanie retikulocytów, następnie anemie hemolityczne oraz wysokoprzepustowe techniki sekwencjonowania (NGS), możliwości analizy transkryptomu, sekwencjonowanie całego eksomu i sekwencjonowanie trzeciej generacji. Wstęp opatrzone jest rycinami które w sposób schematyczny przedstawiają techniki sekwencjonowania. W tekście obecne są nieliczne błędy interpunkcyjne oraz pojedyncze nieścisłości stylistyczne.

Pomijając drobne błędy ta część rozprawy doktorskiej jest interesująca, dokładnie wprowadzająca czytelnika w temat, któremu poświęcona jest całość materiału.

Założenia i cel pracy zostały sformułowane prawidłowo. Autor podjął próbę określenia podstaw molekularnych przypadku anemii hemolitycznej o nieznanym podłożu genetycznym z zastosowaniem wysokoprzepustowych technik sekwencjonowania.

Jako materiał badawczy wykorzystano RNA retikulocytów pochodzących z krwi obwodowej dwóch braci u których występują objawy anemii hemolitycznej, od asymptomatycznych członków rodziny pacjentów (siostra i ojciec) oraz od 3 zdrowych ochotników. Materiał genetyczny matki pacjentów był niedostępny. Protokół badania został zatwierdzony przez Komisję Bioetyczną przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu. Od wszystkich badanych uzyskano świadomą zgodę. Zadania badawcze, jakich podjął się autor rozprawy obejmowały opracowanie wydajnej metody izolacji retikulocytów, ocenę danych pochodzących z sekwencjonowania RNA-Seq i WES pod kątem wariantów powiązanych z fenotypem anemii, ustalenie aktywności enzymatycznej cytozolowej 5'-nukleotydazy pirymidynowej 3A oraz ocenę wpływu miRNA na translację transkryptu genu NT5C3A. Wszystkie badania laboratoryjne zostały wykonane przez profesjonalne laboratoria diagnostyczne. Finansowanie pracy zostało wsparte grantami Narodowego Centrum Nauki, a także grantami Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego. Metody statystyczne zostały dobrane i opisane prawidłowo.

Wyniki stanowią obszerną część monografii obejmującą 36 stron. W pierwszej części autor rozprawy opisuje opracowanie wydajnej metody izolacji reikulocytów z krwi obwodowej co stanowi niewątpliwie istotną część dla dalszych etapów badań. Kolejne elementy wyników to dokładny opis metod izolacji RNA i syntezy cDNA, sekwencjonowania RNA (RNA-Seq) oraz eksomu (WES) technikami nowej generacji (NGS). Autor dokładnie przedstawia analizę ekspresji cytozolowej 5' nukleotydazy pirymidynowej oraz aktywność enzymatyczną i stosunek ilościowy puryn do pirymidyn. Rozdział zawiera liczne ryciny i tabele, które w sposób obrazowy i schematyczny przedstawiają kolejne etapy i metody pracy badawczej. Wyniki zostały opracowane w bardzo szczegółowy i dokładny sposób co świadczy o tym, że autor potrafił zaplanować i zrealizować plan badawczy będący tematem rozprawy doktorskiej.

W dyskusji autor odnosi się do uzyskanych wyników starając się wyjaśnić podłoże i mechanizmy molekularne, które mogły być przyczyną wystąpienia anemii hemolitycznej u analizowanych pacjentów.

We wnioskach autor rozprawy stwierdza, że:

- 1) Analiza transkryptomu retikulocytów wykazała istotny statystycznie spadek ekspresji dziewięciu genów u jednego z pacjentów bez związku z fenotypem HA.
- 2) Liczba wykrytych transkryptów oraz powiązanych szlaków metabolicznych jest wyższa niż w przypadku techniki mikromacierzy.
- 3) Analiza eksomu ujawniła delecję fenyloalaniny w pozycji 149.
- 4) Podczas genotypowania wykazano, że delecja widoczna w sekwencji gDNA jako heterozygotyczna, w mRNA/cDNA u analizowanych pacjentów występuje w postaci homozygotycznej.
- 5) Stosunek nukleotydów purynowych do pirymidynowych jest u pacjentów jest 2,5 razy niższy niż u kontroli.
- 6) Aktywność enzymatyczna cytozolowej 5' nukleotyduazy pirymidynowej 3A u pacjentów jest na niskim poziomie.
- 7) Wariant p.F149 del zdaje się być bezpośrednią przyczyną anemii hemolitycznej u analizowanych chorych.

Rozprawę doktorską mgr Michała Skulskiego oceniam wysoko pod względem merytorycznym. Autor doskonale orientuje się w zaawansowanych technikach laboratoryjnych w tym metodach diagnostycznych biologii molekularnej. Cele rozprawy zostały jasno sprecyzowane, metodyka pracy jest starannie opisana. Wnioski zostały sformułowane w sposób logiczny i zostały odpowiednio przedstawione w odniesieniu do założonych celów. W pracy obecne są nieliczne błędy edytorskie oraz stylistyczne. Bardzo istotnym elementem rozprawy było opracowanie metody izolacji retikulocytów z krwi obwodowej, która pozwala na uzyskanie puli komórek wolnej od innych komórek krwi przy zachowaniu wysokiej wydajności. Niewielkim mankamentem całej pracy jest brak materiału genetycznego matki pacjentów z anemią hemolityczną. Innych uwag nie mam.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65, poz. 595, z późn. Zm). Wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr Michała Skulskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz wyróżnienie tej pracy ze względu na wysoki poziom merytoryczny.