



Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

Samodzielna Pracownia Farmakodynamiki

Szczecin, 02.08.2023

prof. dr hab. Mateusz Kurzawski
Samodzielna Pracownia Farmakodynamiki
Katedra Farmakologii
Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Marcina Słomki

pt. „Zmienność genów kodujących białka z nadrodziny ABC (ATP-binding cassette) w populacji polskiej w odniesieniu do innych populacji”

Transportery ABC to duża rodzina białek błonowych, które są w stanie aktywnie przenosić przez membrany różnorodne egzo- i endogenne substraty, wykorzystując energię z hydrolizy ATP. Główne fizjologiczne funkcje transporterów ABC obejmują, między innymi, transport lipidów, soli kwasów żółciowych, substancji toksycznych, a także peptydów związanych z prezentacją antygenów. W farmakologii ważna jest rola białek ABC w transporcie leków i ich metabolitów. Ze względu na kluczową rolę niektórych transporterów ABC (tj. ABCB1 i ABCG2) w ograniczaniu biodostępności leków, a także możliwość wystąpienia interakcji międzylekowych, ocena, czy dana substancja jest substratem lub inhibitorem tych transporterów jest obecnie wymagana przez FDA i EMA przed rejestracją nowego leku. Rzadkie mutacje w genach ABC znacząco upośledzające ich funkcję, związane są z występowaniem licznych chorób genetycznych, których fenotyp zależny jest od fizjologicznej roli białka, w którego genie występują. Zmienność genów ABC nie ogranicza się jednak w sposób oczywisty do tych mutacji, a w populacjach rozpowszechnione są warianty o słabiej wyrażonym wpływie na funkcję transporterów, których znaczenie kliniczne w większości przypadków nie zostało jeszcze zdefiniowane. Ponieważ geny ABC charakteryzują się znacznym zakonserwowaniem ewolucyjnym, szczególnie w obrębie domen wiążących

nukleotydy, nie można wykluczyć, że wszelkie zmiany genetyczne wpływające bezpośrednio bądź pośrednio na funkcję transporterów mogą mieć konsekwencje w postaci predyspozycji do chorób, losów leków w organizmie i różnic fizjologicznych, zarówno między osobnikami jak i populacjami. Rozprawa doktorska mgr Marcina Słomki, w której Autor podjął bardzo szeroko zakrojone badania dotyczące zmienności genów ABC w populacji polskiej, wpisuje się zatem w bardzo istotny i ważny nurt badawczy i może dostarczyć cennych danych, które mogą być wykorzystane w dalszych badaniach dotyczących funkcji transporterów lub użyte do projektowania testów genetycznych.

Praca przedstawiona do recenzji ma dość nietypowy (hybrydowy) układ, ponieważ zawiera zarówno dwie prace, których doktorant jest pierwszym Autorem, opublikowane w czasopiśmie recenzowanym z listy JCR (tzw. „listy filadelfijskiej”), jak i wyniki badań wcześniej niepublikowanych. Autorowi udało się jednak sprawnie połączyć prezentowane wyniki w całość, opatrzyć wspólnym wstępem i omówić w dyskusji, przez co rozprawa ma przejrzystą formę, w której czytelnikowi łatwo jest odnaleźć wszelkie wymagane elementy. Zakres badań zawartych w rozprawie jest bardzo szeroki, a wskaźniki bibliometryczne i dorobek naukowy kandydata prezentują poziom spotykany w niektórych postępowaniach habilitacyjnych. Praca liczy łącznie niemal 270 stron, z czego znaczną część stanowią przedruki wcześniej opublikowanych prac wraz z obszernymi suplementami. Pozostała część jest sformatowana w sposób typowy dla rozpraw doktorskich, zawiera wstęp, cel pracy, opis wykorzystanych materiałów i metod badawczych, uzyskane wyniki i dyskusję, opatrzone dwoma streszczeniami, w języku polskim i angielskim. Bibliografia została bardzo dobrze dobrana merytorycznie, odpowiednio zacytowana w tekście, zawiera głównie anglojęzyczne artykuły z renomowanych czasopism, opublikowane w ostatniej dekadzie. Liczne tabele i ryciny bardzo ułatwiają czytelnikowi zrozumienie omawianych wyników i mają swoje odnośniki w tekście.

Dobrze napisany, choć niezbyt obszerny wstęp do pracy stanowi merytoryczne i aktualne wprowadzenie do tematyki podejmowanych badań. Autor charakteryzuje budowę i funkcję białek ABC, przytacza przykłady patogennych mutacji w kodujących je genach, opisuje znaczenie transporterów w przebiegu farmakoterapii, w tym zjawisko oporności wielolekowej, a także przytacza nieco informacji na temat współczesnych możliwości prowadzenia populacyjnych badań genetycznych. Wstęp

jest napisany w sposób zrozumiały, klarowny i w pełni uzasadnia podjęcie realizowanych badań.

Zgodnie z tytułem rozprawy, głównym jej celem była charakterystyka zmienności genów kodujących białka ABC w populacji polskiej i jej porównanie z innymi populacjami. Na potrzeby pracy Autor sformułował trzy hipotezy, dotyczące: 1) przewagi rzadkich wariantów w obrębie badanych genów, 2) istotnych różnic pomiędzy populacją polską a populacjami o innym pochodzeniu etnicznym w częstotliwości występowania wariantów genów ABC, 3) istotnych różnic pomiędzy populacją polską a innymi populacjami europejskimi (o podobnym pochodzeniu etnicznym). Cel i hipotezy pracy zostały adekwatnie dobrane, sformułowane w sposób precyzyjny i jednoznaczny.

W rozdziale „Materiał i metody” Autor pracy w pierwszej kolejności przytacza opis prób DNA i metod wykorzystanych przy analizie genów *ABCC1* i *ABCG2*: HRM, sekwencjonowania metodą Sangera (zastosowanego do weryfikacji wyników analizy HRM), a także metody analizy statystycznej nierównowagi sprzężeń oraz analizy *in silico* wpływu wykrytych wariantów niesynonimicznych na funkcję kodowanego białka. Opis metod w tekście rozprawy jest skrótowy, ale ich bardziej szczegółowa, obszerna charakterystyka jest podana we wchodzących w jej skład opublikowanych pracach i suplementach do nich. Znacznie szerzej w dysertacji opisane zostały: metodyka badań genetycznych z wykorzystaniem mikromacierzy oraz narzędzia bioinformatyczne wykorzystane do analizy uzyskanych danych genomowych. Metody opisane są w sposób prawidłowy, chociaż użyty język miejscami nosi znamiona żargonu laboratoryjnego (np. „zimidowane dane”, „zgenotypowane próbki”, „płytki 96-fiolkowe”, „topiony produkt PCR”). Przy opisie analizy asocjacyjnej całego genomu przydałoby się zdanie na temat tego, jakie asocjacje były badane, a przy analizie transkryptomu – niespecjalistyczny opis zawartości użytej bazy danych, co umożliwiłoby czytelnikowi niezwiązanemu z badaniami genomowymi lepsze zrozumienie celowości przeprowadzanych analiz oraz tego, w jaki sposób wykorzystanie tych danych umożliwiło powiązanie uzyskanych wyników badań zmienności genetycznej z ekspresją genów w różnych tkankach.

Uzyskane wyniki przedstawiono w sposób czytelny, w postaci rycin oraz tabel. Wyniki zostały także odpowiednio opisane i skomentowane w tekście pracy. Najbardziej zaawansowane metodycznie są niewątpliwie wyniki (i ich analiza)

dotyczące klastrowania, które dostarczyły ogromu danych do weryfikacji hipotez badawczych postawionych w rozprawie. Niezwykle ciekawa i znacząca klinicznie jest ostatnia z przeprowadzonych analiz, dotycząca związku profilu genetycznego z ryzykiem występowania wybranych chorób cywilizacyjnych, w której wykazano zależne od czynników dziedzicznych ryzyko występowania cukrzycy.

W rozdziale „Dyskusja” uzyskane wyniki zostały przez Doktoranta szerzej omówione na tle dostępnej literatury. Dyskusja przeprowadzona jest precyzyjnie i rzeczowo, Autor w prawidłowy sposób przedstawia najważniejsze osiągnięcia pracy w szerszym kontekście, nie tylko porównując zmienność genetyczną między populacjami, ale także analizując potencjalne przyczyny obserwowanego w modelowaniu klastrowania z uwzględnieniem funkcji badanych genów. Potencjalne wykorzystanie praktyczne uzyskanych wyników może obejmować, między innymi, projektowanie celowanych testów genetycznych, dedykowanych badaniom w populacji polskiej, które mogłyby być użyteczne np. w przypadku określenia predyspozycji genetycznych pacjenta do eliminacji substratów farmakologicznie ważnych transporterów (np. ABCG2 - BCRP).

Bardzo ciekawa, choć niewątpliwie wymagająca dalszej weryfikacji jest obserwacja dotycząca wpływu zmienności w obrębie genów ABC na ekspresję innych genów oraz próba analizy konsekwencji tego zjawiska. Umiejętności prawidłowej interpretacji uzyskanych wyników, oceny wagi poszczególnych obserwacji oraz porównania rezultatów badań własnych z rezultatami innych badaczy świadczą o dojrzałości naukowej Autora i dużym doświadczeniu w pracy naukowej.

Należy uznać, że przeprowadzone badania umożliwiły rzetelną weryfikację hipotez postawionych w pracy, a wnioski zostały przez Autora sformułowane precyzyjnie i mają pokrycie w uzyskanych wynikach.

Najważniejsze uwagi, wymagające, w mojej opinii, ustosunkowania się do nich Doktoranta podczas obrony pracy, są następujące:

- 1) Liczebność grup wykorzystanych w poszczególnych etapach badań została szczegółowo opisana w pracy, jednak nie została w żaden sposób uzasadniona w jej tekście. Czy w badaniach zmienności genów *ABCC1* i *ABCG2* zastosowano jakieś inne, poza pojemnością płytek do PCR, kryteria określenia wielkości grupy

badanej? Czy przeprowadzono jakieś wcześniejsze analizy dotyczące mocy statystycznej badania?

- 2) Doktorant wskazuje w dyskusji, że jednym z ograniczeń badań było zastosowanie w badaniach genomowych mikromacierzy, a technologia ta nie daje pełnej informacji na temat zmienności genetycznej, ponieważ umożliwia jedynie detekcję wariantów wcześniej opisanych, uwzględnionych przy projektowaniu przez producenta mikromacierzy. W konsekwencji, uniemożliwiło to uwzględnienie w analizie genomowej niektórych genów, w tym kodujących ważne farmakologicznie transportery, jak *ABCB1*, *ABCC1* czy *ABCG2*. Dlaczego zatem przy realizacji tak szeroko zakrojonego projektu zdecydowano o wyborze technologii mikromacierzy, a nie sekwencjonowania NGS?
- 3) Autor pracy, klasyfikując obserwowane warianty genetyczne jako rzadkie lub częste, przyjął jako punkt odcięcia częstość ich występowania w badanej populacji równą 0,05 (5%). W wielu innych badaniach stosowana jest jako kryterium częstość 0,01 (1%), co utrudniło Doktorantowi w dyskusji bezpośrednie porównanie uzyskanych wyników z pracami innych autorów. Jakie było uzasadnienie przyjęcia wspomnianego kryterium w analizie?
- 4) W analizie wyników badań genomowych pod kątem ryzyka wybranych chorób cywilizacyjnych, grupa badana została bardzo pobieżnie opisana w zakresie danych klinicznych i demograficznych, autor nie podaje płci ani wieku badanych, ani kryteriów rozpoznania analizowanych chorób. Brak informacji, czy choroby te występowały w rodzinie, czy też były deklarowane przez pacjenta, a np. w przypadku cukrzycy – o jaki typ choroby chodzi. Tymczasem dla wielu z tych chorób wiek lub płeć są czynnikami ryzyka i powinny być w jakiś sposób uwzględnione w analizie, np. poprzez przeprowadzenie dodatkowych porównań w obrębie kobiet i mężczyzn oraz w podgrupach osób w różnym wieku.

Ponadto, tekst pracy zawiera także pewne drobne błędy o charakterze typograficznym i gramatycznym. Błędów tych jednak nie przytaczam, ze względu na brak ich znaczenia dla merytorycznej oceny pracy.

Podsumowując, przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki 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. z 2017 r., poz. 1789), tj. stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w dyscyplinie nauki biologiczne oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. W związku z powyższym, zwracam się do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o dopuszczenie Pana mgr Marcina Słomki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę wysoki poziom merytoryczny i zastosowanie nowoczesnych metod badawczych oraz zaawansowanych bioinformatycznych metod analizy danych, a także unikatowość uzyskanych wyników badań genetycznych, zwracam się do Komisji z wnioskiem o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pana mgr Marcina Słomki. W mojej opinii, zakres badań przeprowadzonych i przedstawionych przez Doktoranta znacznie przekracza wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Dodatkowym argumentem uzasadniającym wyróżnienie pracy jest fakt opublikowania części wyników w formie dwóch artykułów w czasopismach o relatywnie wysokim współczynniku *impact factor*, które na dzień sporządzania recenzji były 15 razy cytowane przez innych autorów (wg. bazy *Scopus*).

KIEROWNIK
Samodzielnej Pracowni Farmakodynamiki

Prof. dr hab. Mateusz Kurzawski