

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani lek. Agnieszki Domin

pt. „Ocena układu wewnątrzwydzielniczego i wybranych biomarkerów metabolizmu u pacjentów narażonych na prenatalną ekspozycję na alkohol”

Zgodnie z uchwałą Rady Naukowej Kolegium Nauk Medycznych Uniwersytetu Rzeszowskiego z dnia 23 czerwca 2022 r. o powołaniu mnie na recenzenta ww. rozprawy doktorskiej mam zaszczyt przedstawić niniejszą opinię.

I. Uzasadnienie wyboru tematu

Nadużywanie alkoholu dotyczy ponad 2,5 mln Polaków, a uzależnionych od alkoholu jest w Polsce 700-900 tys. osób. Niekorzystny wpływ alkoholu na przebieg ciąży, rozwój płodu i dziecka jest powszechnie znany, niemniej jednak nawet 50% kobiet przyznaje się do picia alkoholu w ciąży przed jej rozpoznaniem, kilka do kilkunastu procent kontynuuje spożywanie napojów alkoholowych przez cały czas trwania ciąży a około 3% pije jego znaczne ilości. Najnowsze dane mówią o niemal 10% kobiet pijących w ciąży.

Termin „poalkoholowe spektrum zaburzeń rozwojowych” (FASD) obejmuje tzw. „parasol” różnorodnych zaburzeń związanych z wewnątrzmaciczną ekspozycją na alkohol. Zespół ekspertów działający przy Państwowej Agencji Rozwiązywania Problemów Alkoholowych (PARPA) w swoich rekomendacjach z września 2020 r. wyróżnia w FASD dwie wzajemnie przenikające się i uzupełniające kategorie diagnostyczne: płodowy zespół alkoholowy (FAS) oraz zaburzenia neurorozwojowe związane z prenatalną ekspozycją na alkohol (ND-PAE). Dodatkowo wyróżniono niediagnostyczną kategorię „ryzyko FASD”. Ryzyko wystąpienia FASD w czasie całej ciąży jest zmienne i zależne od długości okresu ekspozycji na alkohol, intensywności jego spożywania oraz częstości występowania stanu upojenia alkoholowego. W pierwszym trymestrze wzrasta ono 12-krotnie, w I i II trymestrze – 61-krotnie, zaś w całej ciąży 65-krotnie.

Liczba osób ze spektrum FASD nie jest dokładnie znana. Szacuje się, że na świecie częstość występowania tych zaburzeń wynosi około 7,7/1000, zaś w Europie prawie 19,8/1000. Według badania "Alicja" przeprowadzonego przez PARPA w kilku powiatach w Polsce w latach 2012-2014 rozpowszechnienie FASD wśród polskich 7-9-latków jest nie mniejsze niż 2%, w tym 0,4% stanowią przypadki FAS.

Dziecko narażone w okresie prenatalnym na alkohol wykazują szerokie spektrum objawów, z których większość nie jest specyficzna i może manifestować się w różny sposób w ciągu całego życia. W pierwszym trymestrze ciąży alkohol może spowodować obumarcie zarodka, poważne uszkodzenie ośrodkowego układu nerwowego (OUN), powstanie wad wrodzonych serca, nerek oraz dysmorfie twarzy. W drugim trymestrze zachodzi ryzyko uszkodzenia OUN, układu kostnego, uzębienia i układu endokrynnego. Nieliczne dane wskazują, że spożywanie alkoholu przez ciężarne kobiety modyfikuje funkcjonowanie osi hormonalnych zarówno matki, jak i płodu, ale do tej pory nie ustalono jednoznacznie jego wpływu na działanie układu dokrewnego w dalszym życiu dziecka. W trzecim trymestrze ciąży alkohol może spowodować dalsze zaburzenie kształtowania mózgu, dojrzewania płuc oraz opóźnienie wzrastania i dojrzewania płodu (IUGR). Dzieci matek pijących alkohol w ciąży często rodzą się przedwcześnie, z niską w stosunku do wieku ciążowego masą ciała (SGA) a w późniejszym okresie diagnozowane są endokrynologicznie z powodu niedoboru wzrostu i/lub masy ciała. Z kolei w okresie dojrzewania, z uwagi na tzw. „oszczędny fenotyp”, pacjenci z FASD mogą rozwijać otyłość i zaburzenia metaboliczne.

W piśmiennictwie światowym do tej pory nie opublikowano wyników szczegółowych i kompleksowych badań dotyczących zaburzeń endokrynologicznych i metabolicznych oraz ich wpływu na zaburzenia rozwoju i dojrzewania u dzieci z FASD. W związku z tym ocena schorzeń współwystępujących z zaburzeniami powodowanymi prenatalną ekspozycją na alkohol oraz zaburzeń metabolicznych i układu wewnątrzwydzielniczego u tych pacjentów jest w pełni uzasadniona, a podjęty przez Doktorantkę temat rozprawy doktorskiej charakteryzuje się istotnymi walorami poznawczymi i klinicznymi.

II. Redakcja przedłożonej pracy, poprawność metodyczna, wartość merytoryczna przedstawionych wyników

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska liczy 167 stron. Ma ona typowy układ pracy naukowej i składa się z 39 stronicowego *Wstępu*, *Celu pracy*, 11-stronicowego rozdziału *Material i metody*, 51-stronicowego przedstawienia *Wyników badań*, 18-stronicowej

Dyskusji, 6 wniosków, *Streszczenia* w języku polskim i angielskim, 320 pozycji piśmiennictwa, *Załączników*, *Spisów rycin i tabel* oraz *Wykazu skrótów*.

Rozdział *Wstęp*, zawiera 2 duże podrozdziały poświęcone spektrum płodowych zaburzeń alkoholowych (FASD) oraz białku Klotho. W pierwszym z nich Pani lek. Agnieszka Domin opisuje wpływ alkoholu na rozwój płodu, ze szczególnym uwzględnieniem układu dokrewnego, epidemiologię problemu alkoholowego oraz nomenklaturę kategorii diagnostycznych FASD. Doktorantka syntetycznie przedstawia rekomendacje diagnostyczne obowiązujące w Polsce, ale także wytyczne kanadyjskie, czterocyfrowy kwestionariusz waszyngtoński oraz kryteria Amerykańskiej Akademii Pediatrii z 2016 roku, co jest niezwykle istotne wobec braku jednolitego konsensusu dotyczącego diagnozowania FASD na świecie i świadczy o doskonałej orientacji Autorki w tym zakresie. Przyswojenie przez czytelnika poszczególnych systemów klasyfikacyjnych FASD ułatwiają schematy przedstawione na rycinach. Dalej Pani lek. Agnieszka Domin niezwykle dokładnie omawia wrodzone zaburzenia związane z prenatalną ekspozycją na alkohol. Typowe cechy dysmorficzne przedstawia na własnoręcznie wykonanych rysunkach oraz licznych fotografiach pacjentów. Najczęstsze anomalie rozwojowe, charakterystyczne zaburzenia neurorozwojowe oraz zaburzenia wtórne zostały dodatkowo podsumowane w tabelach. Autorka syntetycznie przedstawia diagnostykę różnicową FASD, posługując się klasyfikacją OMIM oraz możliwości terapeutyczne i strategie postępowania w FASD. Z powyższym podrozdziałem *Wstępu* zapoznałam się z dużą przyjemnością, będąc przekonaną nie tylko co do doskonałego przygotowania teoretycznego Doktorantki, ale również Jej dużego doświadczenia klinicznego w opiece nad dziećmi z FASD. W kolejnym podrozdziale Pani lek. Agnieszka Domin przedstawia ogólne informacje na temat białka Klotho, strukturę jego genu i funkcje poszczególnych izomerów. Cały rozdział pt. *Wstęp* stanowi bardzo dobre i wyczerpujące wprowadzenie w zagadnienia będące podstawą założeń pracy i dowodzi dobrego przygotowania teoretycznego Doktorantki do realizacji zaplanowanych zadań. Autorka w sposób bardzo przystępny, a zarazem wnikliwy przedstawia aktualne dane literaturowe, omawiając zagadnienia istotne z punktu widzenia podjętej pracy badawczej.

Głównym celem badań Pani lek. Agnieszki Domin jest ocena schorzeń współwystępujących z zaburzeniami powodowanymi prenatalną ekspozycją na alkohol oraz zaburzeń metabolicznych i układu wewnątrzwydzielniczego u tych pacjentów. Cele szczegółowe obejmują:

1. Ocenę badanej populacji pod względem częstości występowania niskiej masy urodzeniowej i zaburzeń z nią związanych.

2. Ocenę gospodarki wapniowo-fosforanowej w badanej populacji.
3. Ocenę częstości występowania niskorosłości i niedoboru masy ciała oraz ich związku z niską masą urodzeniową i zaburzeniami pokwitania w badanej populacji dzieci z FASD.
4. Ocenę przyczyn niskorosłości oraz częstości współwystępowania z FASD innych schorzeń (w tym układu dokrewnego) w badanej populacji.
5. Ocenę częstości występowania nadwagi i otyłości w badanej populacji.
6. Ocenę zaburzeń gospodarki wapniowo-fosforanowej, węglowodanowej, lipidowej i IGF-1 w korelacji z białkiem Klotho w badanej populacji.

W rozdziale *Materiał i metody* Autorka charakteryzuje grupę badaną, przedstawia kryteria włączenia i wyłączenia oraz dokładnie opisuje zastosowaną metodykę, analizowane zmienne i wskaźniki, a także testy statystyczne. Badaniami objęto 64 ze 108 dzieci z potwierdzonym rozpoznaniem ze spektrum FASD, pozostających obecnie lub w przeszłości pod opieką II Kliniki Pediatrii, Endokrynologii i Diabetologii Dziecięcej oraz Poradni Endokrynologicznej dla Dzieci Klinicznego Szpitala Wojewódzkiego Nr 2 im. św. Jadwigi Królowej w Rzeszowie. Pacjentów na podstawie obowiązujących polskich rekomendacji zaszeregowano do 3 grup: FAS, ND-PAE oraz „ryzyko FASD”. W badaniu uczestniczyła również grupa kontrolna 23 zdrowych dzieci. Uzupełnieniem rozdziału *Materiał i metody* jest załącznik 1 zawierający formularz badania fizykalnego i dysmorfii. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Rzeszowskim, a rodzice lub opiekunowie prawni dzieci biorących udział w badaniu wyrazili świadomą, pisemną zgodę na przeprowadzenie badań wg zaplanowanego protokołu oraz w przypadku kilkorga pacjentów na wykorzystanie dokumentacji fotograficznej dysmorfii.

Rozdział ten potwierdza duże doświadczenie Doktorantki, która bardzo przystępnie przedstawia proces kwalifikacji pacjentów, przeprowadzane pomiary antropometryczne, badania biochemiczne, wyliczane na ich podstawie parametry oraz wartości referencyjne. W osobnym podrozdziale Autorka przedstawia zastosowane metody analizy statystycznej.

Usystematyzowane wyniki swoich badań Pani lek. Agnieszka Domin prezentuje w 51 tabelach i na 11 czytelnych rycinach, opatrując je właściwym opisem/tytułem i rzeczowym komentarzem. Opracowanie statystyczne wyników zostało przeprowadzone prawidłowo, z wykorzystaniem adekwatnie dobranych metod. Za minimalny poziom istotności przyjęto wartość 0,05.

Na podstawie przeprowadzonych badań Doktorantka stwierdziła istotnie statystycznie większą liczbę dzieci z niską urodzeniową masą ciała (SGA) w grupie dzieci z FAS. W grupie tej liczba dzieci z niskorosłością była istotnie wyższa niż w grupie ND-PAE i kontrolnej a ryzyko wystąpienia niskorosłości jest 3,3-krotnie wyższe niż w grupie ND-PAE. W toku dalszej analizy uwzględniającej urodzeniową masę ciała, Autorka wykazała, że u pacjentów z grupy ND-PAE częstość występowania niskorosłości była wyższa u dzieci z niską urodzeniową masą ciała (SGA). Nie zaobserwowała natomiast wpływu urodzeniowej masy ciała na częstość występowania somatotropinowej niedoczynności przysadki w żadnej z badanych grup. Analiza masy ciała wykazała jej niedobór (wartości <3 centyla) u ponad 53% dzieci z FAS, 22% z ND-PAE i żadnego dziecka z grupy „ryzyko FASD”, zaś łączny niedobór masy ciała i wzrostu (oba parametry < 3 centyla) dotyczył odpowiednio 17, 7 i 0% badanych. Niski wskaźnik masy ciała (BMI) < 3 centyla stwierdziła u ponad 64% dzieci z FAS, 17% dzieci z ND-PAE i żadnego dziecka z grupy „ryzyko FASD”. Nadwagę zaobserwowała u 1 dziecka z grupy ND-PAE, a otyłość również u 1 dziecka z tej grupy. Małogłowie dotyczyło 76% dzieci z FAS i 40% dzieci z ND-PAE. U 2 dziewczynek z FASD stwierdzono przedwczesne pokwitanie a u kolejnych 2 w toku dalszej obserwacji rozpoznano przedwczesne pokwitanie ze złą prognozą wzrostową.

Analiza parametrów metabolicznych wykazała wyższe wartości odsetka HbA1c u dzieci z ND-PAE w porównaniu z FAS, jednakże wszystkie wyniki u badanych pacjentów mieściły się w granicach normy. Wartości glikemii na czczo również były prawidłowe i nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami. U 7 dzieci z FASD stwierdzono nieprawidłowe wartości wskaźnika QUICKI, u 3 – podwyższone stężenia insuliny na czczo, a u 2 – nieprawidłowe wartości HOMA-IR. W zakresie gospodarki lipidowej podwyższone stężenia cholesterolu całkowitego wykazano u 4 dzieci, obniżony HDL-cholesterol u 10, podwyższony LDL-cholesterol u 8 a nieprawidłowe stężenia triglicerydów u 3.

Ocena wyników badań hormonalnych wykazała niedoczynność tarczycy u 2 dzieci, w tym 1 dziewczynki leczonej rekombinowanym hormonem wzrostu z powodu somatotropinowej niedoczynności przysadki. U 1 dziewczynki w trakcie obserwacji stwierdzono przejściową nadczynność tarczycy na tle choroby Hashimoto. W całej badanej grupie nie wykazano zaburzeń w funkcjonowaniu osi podwzgórze-przysadka-nadnercza oraz zaburzeń gospodarki wapniowo-fosforanowej. Wykazano natomiast znaczne rozpowszechnienie niedoboru witaminy D u ponad 50% dzieci z SGA wyłonionych z całej badanej grupy.

W grupie FAS Doktorantka zaobserwowała niższe wartości wskaźnika IGF-1 w porównaniu z grupą ND-PAE. Stwierdziła także zależność pomiędzy wskaźnikiem IGF-1 a centylem masy ciała, centylem wysokości ciała oraz centylem BMI.

Stężenia białka Klotho były najwyższe w grupie FAS w porównaniu do grupy ND-PAE i kontrolnej, jednakże nie były to różnice istotne statystycznie.

Analiza korelacji u wszystkich badanych dzieci wykazała oczywisty związek pomiędzy tygodniem ciąży w czasie narodzin dziecka a masą urodzeniową. Co ciekawe, zależności tej nie stwierdzono w grupie FAS. Ponadto, w całej badanej grupie Autorka potwierdziła znane z literatury i praktyki korelacje pomiędzy BMI a wskaźnikami HOMA i QUICKI, a także zależności pomiędzy parametrami gospodarki węglowodanowej a wskaźnikiem aterogennym. U dzieci z FAS, w odróżnieniu od pacjentów z ND-PAE, wykazała też istotną ujemną korelację pomiędzy SD masy urodzeniowej a odsetkiem HbA1c.

Stężenia białka Klotho w grupie dzieci z FASD, jak i w poszczególnych podgrupach nie korelowały istotnie z badanymi parametrami antropometrycznymi, biochemicznymi i hormonalnymi za wyjątkiem korelacji pomiędzy białkiem Klotho a stężeniem PTH i magnezu w grupie ND-PAE.

W rozdziale *Dyskusja* Autorka analizuje wyniki swoich badań, konfrontując i zestawiając je w porównaniu do osiągnięć najważniejszych badaczy z omawianego tematu, publikujących zarówno w Polsce jak i na całym świecie. Umiejętnie stawia i weryfikuje swoje hipotezy, co świadczy o jej dużej dojrzałości zarówno klinicznej, jak i naukowej. Jest również świadoma ograniczeń przeprowadzonych przez siebie badań.

Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka formułuje 6 wniosków.

Rozprawę wieńczy *Streszczenie* w języku polskim i angielskim oraz rozdział *Piśmiennictwo*. Obejmuje on 320 pozycji z piśmiennictwa polskiego i zagranicznego.

III. Uwagi recenzenta

Z obowiązku recenzenta oraz wiedzioną własną ciekawością naukową pozwolę sobie zwrócić uwagę na kilka uchybień w pracy i zasugerować uwzględnienie dodatkowych aspektów podczas przygotowywania publikacji do druku:

- Rozdział *Wstęp* logicznie byłoby rozpocząć od podrozdziału 1.1.4, zaś wpływ alkoholu na funkcjonowanie układu endokrynnego omówić w rozdziale 1.1.8. Podrozdział 1.1.1 należałoby scalić z podrozdziałem 1.1.8.1
- Numeracja piśmiennictwa we *Wstępie* wymaga uporządkowania – po pozycji [5] na stronie 10, na kolejnej stronie pojawiają się pozycje [57-59] a następnie [262] i [320]!

- W mojej opinii cele szczegółowe 2. i 6. oraz 3. i 4. można połączyć
- Podrozdział 3.1. „Charakterystyka badanej grupy” zawiera dość niefortunne i wprowadzające czytelnika w błąd sformułowanie, że badaniami objęto grupę 108 dzieci. W rzeczywistości do badania zaproszono 108 dzieci ze zdiagnozowanym FASD a do badania włączono 64 pacjentów, których rodzice lub opiekunowie wyrazili na nie zgodę. Czy zgodę uzyskano również od pacjentów powyżej 16 roku życia? W jaki sposób rekrutowano grupę kontrolną zdrowych dzieci? Jakie były kryteria włączenia i wyłączenia dla tej grupy?
- Zwraca również uwagę dość szeroki zakres wieku badanych dzieci – w grupie FAS 5 miesięcy-16,5 lat, w grupie ND-PAE 2,5-13,5 lat. Wiek dziewczynek z grupy kontrolnej był ponadto istotnie niższy niż dziewczynek z FASD. Nie znajduję również informacji na temat liczby dzieci prepubertalnych i pubertalnych w badanych grupach. Czy ewentualne różnice mogły wpłynąć na uzyskane wyniki i w jaki sposób?
- Dlaczego Autorka zdecydowała się na korzystanie z siatek centylowych dla populacji dzieci warszawskich opracowanych przez Palczewską i Niedźwiedzka dla badanych powyżej 5 roku życia, a dla pacjentów poniżej tego wieku wybrała siatki WHO? Mam również wątpliwości co do adekwatności pomiaru wysokości ciała na stadiometrze dla dzieci w wieku poniżej 2 lat.
- Czy zamiast wyliczania wskaźnika IGF-1 nie można zastosować liczby odchyień standardowych od średniej?
- W rozdziale *Material i metody* brakuje informacji na temat metod laboratoryjnych używanych do oznaczeń stężeń hormonów – jest to szczególnie istotne w przypadku oznaczeń insuliny, IGF-1 i parathormonu. Jaka była czułość oraz wartości zmienności wewnątrz- i zewnątrzgrupowej dla zestawu do oznaczeń stężeń białka Klotho?
- W rozprawie Autorka nie przedstawia wyników dotyczących oceny wieku kostnego badanych dzieci, a zatem podrozdział 3.2.6 jest zbędny
- W podrozdziałach dotyczących analizy masy ciała, BMI, obwodu głowy oraz parametrów metabolicznych i hormonalnych brakuje oceny znamienności statystycznej częstości występowania nieprawidłowych wartości ww. parametrów w poszczególnych podgrupach (test χ^2)
- W tabelach zawierających korelacje jednoczynnikowe oprócz wartości współczynnika korelacji dobrze byłoby podać również wartość p

- W tabeli 46 mediana oraz rozstęp międzykwartylowy dla stężeń białka Klotho w poszczególnych grupach pacjentów wynoszą 0,00. Czy oznacza to, że większość uzyskanych wyników było poniżej czułości zastosowanej metody?
- Celem lepszej orientacji czytelnika, *Dyskusja* powinna zostać podzielona na podrozdziały. W rozdziale tym należy unikać powtórzeń informacji podanych uprzednio we *Wstępie*
- Wniosek 5. nie jest do końca poparty uzyskanymi wynikami, a wniosek 6. nie odpowiada celowi 6. pracy
- Streszczenie powinno być bardziej zwarte
- Należy ujednolicić zakres informacji zawartych w sygnaturach cytowanych prac w rozdziale *Piśmiennictwo*. W szczególności dotyczy to liczby podawanych autorów, sposobu cytowania pozycji książkowych oraz roku publikacji, który w większości cytowań niepotrzebnie pojawia się dwukrotnie. Na stronie 126 w pierwszej pozycji od góry brakuje numeru cytacji, z kolei pozycje [278] i [279] są zdublowane.
- Korekty wymagają błędy literowe, interpunkcyjne, stylistyczne i edytorskie.

IV. Wniosek końcowy

Przedstawione powyżej uwagi nie umniejszają wartości merytorycznej pracy, którą przeczytałam z dużym zainteresowaniem i oceniam bardzo wysoko.

Pani lek. Agnieszka Domin bardzo dobrze zaprojektowała badanie a cele, jakie sobie założyła, zrealizowała poprzez rzetelną analizę i trafną interpretację uzyskanych danych. Przedstawione wyniki pracy mają bardzo duże znaczenie nie tylko poznawcze, ale również praktyczne, wskazując na ważną rolę endokrynologa i diabetologa dziecięcego w zespole sprawującym opiekę nad dziećmi z FASD. Poczynione przez Doktorantkę obserwacje sugerujące, że niskorosłość u dzieci z FAS nie wykazuje związku z niską urodzeniową masą ciała oraz czynnością somatotropinową przysadki są zgodne z klinicznymi doświadczeniami własnymi recenzenta, który jednakże nie może pochwalić się tak liczną grupą pacjentów z tym zaburzeniem. Badania Pani lek. Agnieszki Domin wskazują na konieczność podjęcia dalszych wieloośrodkowych badań celem ustalenia optymalnego sposobu leczenia niedoboru wzrostu u dzieci prenatalnie narażonych na alkohol. Inną ciekawą obserwacją są wyższe stężenia białka Klotho stwierdzane u dzieci z FASD i małopłowiem, co może sugerować jego udział w rozwoju OUN.

Podsumowując, stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani lek. Agnieszki Domin pt. „Ocena układu wewnątrzwydzielniczego i wybranych biomarkerów metabolizmu u pacjentów narażonych na prenatalną ekspozycję na alkohol” spełnia wszystkie warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2021 poz. 478 z późn. zm.). W związku z powyższym wnioskuję do Wysokiej Rady Naukowej Kolegium Nauk Medycznych Uniwersytetu Rzeszowskiego o dopuszczenie Pani lek. Agnieszki Domin do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


prof. dr hab. n. med. Joanna Oświęcimska