

Rzeszów 11.11.2020r

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Lekarz Anny Ruszały

„Wybrane aspekty zaburzeń hormonalnych i metabolicznych u dziewcząt z zespołem Turnera „

Wiodącym tematem w pracy badawczej lek med. Anny Ruszały były badania nad zespołem Turnera, który jest poważnym wielodyscyplinarnym problemem leczniczym i społecznym z uwagi na częstość występowania, 1:2500 żywo urodzonych dziewcząt oraz szerokie spektrum zaburzeń, poczynając od wad wrodzonych, głównie układu krążenia, nerek oraz słuchu, niskiego wzrostu końcowego, braku u większości chorych rozwoju płciowego w okresie dojrzewania, skłonności do występowania chorób autoimmunizacyjnych, otyłości, nadciśnienia i cukrzycy oraz chorób układu sercowo naczyniowego w wieku dorosłym. Z punktu widzenia pacjentki i jej rodziny rozpoznanie zespołu Turnera stanowi osobistą tragedię, a występujące liczne zaburzenia i ich powikłania są także problemem społecznym ze względu na konieczność leczenia wielodyscyplinarnego. Tym większa jest wartość badań podjętych przez lek med. Annę Ruszałę zakończonych cyklem prac pod tytułem „Wybrane aspekty zaburzeń hormonalnych i metabolicznych u dziewcząt z zespołem Turnera”, stanowiącą ważny element w wyjaśnianiu problemów związanych z tym zagadnieniem.

Redakcja przedłożonej pracy, poprawność metodyczna, wartość merytoryczna przedstawionych wyników, ocena wniosków pracy.

Przedłożona do oceny praca rozpoczyna się od obszernego Wstępu, w którym w kolejnych podrozdziałach Doktorantka wprowadzają czytelnika w aktualny przegląd zagadnień związanych z tematyką pracy takich jak: etiologia, epidemiologia, diagnostyką i leczenie dziewcząt z Zespołem Turnera.

Cykl prac, na podstawie którego powstała rozprawa doktorska składa się z trzech spójnych tematycznie artykułów, poświęconych analizie wybranych zaburzeń hormonalnych i metabolicznych u dziewcząt chorych na Zespół Turnera (ZT). Wszystkie artykuły zostały opublikowane w recenzowanych czasopismach medycznych, indeksowanych w bazie PubMed, o łącznym wskaźniku oddziaływania (*Impact Factor, IF*) 4,45 i punktacji MNiSW wynoszącej 95 pkt. Zgodne oświadczenie współautorów wskazuje na to, że wkład Kandydatki zarówno w opracowanie koncepcji badań, jak i ich wykonanie jest dominujący lub znaczący. Doktorantka jest pierwszym autorem dwóch prac i drugim autorem w jednej. Wartość naukowa zawartych w rozprawie doniesień nie pozostawia wątpliwości. Dwa z nich zostały opublikowane w czasopismach z Listy Filadelfijskiej a jedna w renomowanym czasopiśmie endokrynologicznym, co oznacza, że z powodzeniem przeszły gęste sito recenzji poszczególnych redakcji. Artykuły zawierają wyniki badań prowadzonych u pacjentek z ZT w Klinice Endokrynologii Dzieci i Młodzieży, Katedry Pediatrii, Instytutu Pediatrii, UJCM w Krakowie. Dobór publikacji układa się w logiczną całość. Wspólnym celem cyklu trzech prac była analiza wybranych parametrów metabolicznych i hormonalnych oraz ich relacji ze stosowanym leczeniem, w szczególności z hormonalną terapią zastępczą u dziewcząt z ZT w okresie przed i w trakcie dojrzewania płciowego.

Tematyka w nich poruszana obejmowała:

- Analizę wpływu ultra niskich dawek 17beta estradiolu stosowanych u dziewcząt w wieku 8-12 lat, przed rozpoczęciem standardowej indukcji dojrzewania, na wybrane parametry metaboliczne. Praca ta otrzymała pierwszą nagrodę im. T.E. Romera Polskiego Towarzystwa Endokrynologii i Diabetologii Dziecięcej dla najlepszej polskiej publikacji z dziedziny endokrynologii i diabetologii dziecięcej opublikowanej w roku 2017.
- W drugiej z prac oceniono występowania bezobjawowych, biochemicznych zaburzeń czynności wątroby oraz ich związek z otyłością i substytucją hormonami płciowymi.
- W pracy trzeciej przedstawiono wstępne wyniki analizy przydatności oznaczeń stężeń hormonu antymüllerowskiego (AMH) i inhibiny B jako markerów czynności jajników.

Celem przedstawionego cyklu trzech prac była analiza wybranych parametrów metabolicznych i hormonalnych oraz ich relacji ze stosowanym leczeniem, w szczególności z hormonalną terapią zastępczą u dziewcząt z ZT w okresie przed i w trakcie dojrzewania płciowego.

Celem szczegółowym **pracy 1** była ocena wpływu substytucji małymi dawkami estrogenów w okresie okołopokwitaniowym (8-12 lat), na wybrane parametry metaboliczne i auksologiczne u chorych na ZT.

Celem szczegółowym **pracy 2** była analiza wpływu hormonalnej terapii zastępczej i otyłości na funkcję wątroby, u pacjentek z ZT podczas kilkuletniej obserwacji.

Celem szczegółowym **pracy 3**, była próba określenia przydatności oznaczenia stężeń AMH i inhibiny B do oceny funkcji jajników, jako uzupełnienie konwencjonalnej diagnostyki hipogonadyzmu u dziewcząt z ZT.

Badaniami objęto pacjentki Kliniki Endokrynologii Dzieci i Młodzieży, Katedry Pediatrii, Instytutu Pediatrii UJCM z potwierdzonym badaniem genetycznym ZT.

Wyznaczone cele Autorka realizowała dzięki przemyślanej metodyce badań oraz przeprowadzonej adekwatnej, wnikliwej, nowoczesnej analizie statystycznej.

Z wynikami badań recenzent mógł się zapoznać w przedstawionym opisie wstępnym recenzowanego cyklu prac jak i w kopiach oryginalnych publikacji prac w czasopismach

Ad 1.

W chwili włączenia do badania wartości ocenianych parametrów metabolicznych i auksologicznych nie różniły się pomiędzy grupami, to po trzech latach obserwacji u dziewcząt stosujących niskie dawki 17beta estradiolu w wieku 8-12 lat, stwierdzono znamienne niższe średnie stężenie cholesterolu całkowitego i cholesterolu LDL (odpowiednio: 3,8 vs 4,4 mmol/l, $p = 0,004$; 1,9 vs 2,4 mmol/l, $p = 0,03$). Podobnie, chociaż już bez znamienności statystycznej, korzystniejsze z punktu widzenia ryzyka metabolicznego wartości stężeń, miały także inne oceniane w surowicy wskaźniki metaboliczne (trójglicerydy 1,2 vs 1,3 mmol/l; glukoza na czczo 4,6 vs 4,8 mmol/l; glukoza 120 minut po obciążeniu doustnym (OGTT, test doustnego obciążenia glukozą) 5,2 vs 6,0 mmol/l; insulina na czczo 12,3 vs 15,6 μ U/ml; insulina 120 minut po obciążeniu doustnym (OGTT) 62,7 vs 83,7 μ U/ml). Również wartość wskaźnika HOMA-IR była niższa w grupie w której stosowano niskie dawki 17beta estradiolu (2,5 vs 3,6). Porównując wpływ wczesnego wprowadzenia niskodawkowej substytucji estrogenowej na rozwój somatyczny, nie stwierdzono niekorzystnego wpływu na przebieg wzrastania, awans wieku kostnego ani zmiany BMI. Ultra niskie dawki 17beta estradiolu nie spowodowały rozwoju gruczołów piersiowych u żadnej z pacjentek.

Ad 2.

W chwili włączenia do badania, nieprawidłową, zwiększoną aktywność aminotransferaz wątrobowych została udokumentowana u aż 34% pacjentek, u żadnej z badanych nie stwierdzono jawnej choroby wątroby. U 18 (32%) spośród wyżej wymienionych, nie stosowano suplementacji hormonami płciowymi, 16 (36%) takie leczenie otrzymywało. Średnia wartość aktywności AST wynosiła 42,7 IU/l u nieleczonych hormonami płciowymi i 44,2 IU/ml u stosujących to leczenie. Wartości ALT w obu grupach wynosiły odpowiednio: 27,5 IU/l i 29,9 IU/l. Różnice nie były znamienne statystycznie. Zwiększoną aktywność AST i ALT stwierdzono odpowiednio u 10 i 9 chorych niestosujących oraz u 5 i 11 stosujących hormonalną terapię zastępczą. Średnie wartości aktywności AST u badanych z otyłością nie różniły się znamienne w porównaniu do chorych z prawidłową masą ciała i wynosiły odpowiednio: 47,5 IU/l i 42,5 IU/l. U pacjentek z ZT i otyłością stwierdzono natomiast znamienne statystycznie większą aktywność ALT 35,6 IU/l vs 27 IU/l, $p=0,037$. Pogłębiona analiza statystyczna nie wykazała jednak zwiększonego ryzyka zaburzeń czynności wątroby u otyłych chorych na ZT w porównaniu do chorych z prawidłową masą ciała. Podobnie, nie stwierdzono aby takie ryzyko było zwiększone w trakcie stosowania terapii hormonami płciowymi. W trakcie okresu obserwacyjnego analiza wyników powtarzanych co rok oznaczeń aktywności aminotransferaz wątrobowych, nie wykazała znamiennej zmiany częstości występowania dysfunkcji wątroby.

Ad 3.

Samoistne dojrzewanie płciowe, definiowane jako rozwój piersi oceniony na stopień II lub wyższy w skali Tannera, wystąpiło u 16 spośród 35 włączonych do badania chorych na ZT dziewcząt. Średni wiek początku dojrzewania płciowego wynosił 10 lat. W przeważającej części grupy dojrzewających samoistnie stwierdzono kariotyp mozaikowy (87,5% chorych), podczas gdy u dziewcząt niedojrzewających samoistnie występował on jedynie u 47%. Grupa pokwitających samoistnie, w porównaniu do dziewcząt u których pokwitanie nie wystąpiło, charakteryzowała się mniejszymi średnimi wartościami stężeń FSH: 24,5 IU/l (zakres: 1,14-91,1) vs 66,5 IU/l (7,7-196,4) ($p=0,002$), większymi średnimi stężeniami estradiolu: 28,4 pg/ml (10,5-68,8) vs 14,9 pg/ml (6,1-26,0) ($p=0,005$), AMH: 0,8 ng/ml [0,0-3,11] vs 0,003 ng/ml (0,0-0,002) ($p=0,001$) i inhibiny B: 29,1 pg/ml (0,0-110,0) vs 1,06 pg/ml (0,0-11,0) ($p=0,026$). U trzech pacjentek z grupy pokwitających samoistnie, bez podwyższonego stężenia FSH ($FSH < 35 \text{ mIU/ml}$), stwierdzono jednak zerowe stężenia AMH i inhibiny B.

Następnie Doktorantka przedstawiła wnioski, które były odpowiedzią na postawione przez siebie cele pracy.

1. Substytucja estradiolem wprowadzona wcześniej oraz w znacznie mniejszej dawce niż rekomendowana dla indukcji dojrzewania płciowego, może u chorych ZT korzystnie wpłynąć na profil lipidowy i inne parametry ryzyka metabolicznego. Takie postępowanie wydaje się nie mieć negatywnego wpływu na rozwój somatyczny i skuteczność leczenia rhGH.
2. Biochemiczna dysfunkcja wątroby nie jest wyłącznie cechą dorosłych pacjentek z ZT, ale dotyczy także dziewcząt w wieku poniżej 18 lat. Współwystępowanie

otyłości ani stosowanie preparaty estrogenowych nie zwiększają ryzyka rozwoju zaburzeń funkcji wątroby w tej grupie pacjentek.

3. Ocena stężeń AMH i inhibiny B, może być wartościowym elementem oceny funkcji jajników u młodych pacjentek z zespołem Turnera. Niskie stężenia AMH i inhibiny B mogą wskazywać na ryzyko niewydolności jajników nawet u tych pacjentek, które rozpoczęły dojrzewanie płciowe samoistnie i u których nie stwierdzono hipogonadyzmu hipergonadotropowego.

Całość pracy wieńczy 66 pozycji aktualnego i starannie dobranego *Piśmiennictwa*, oraz zwięzłe i rzetelne *Streszczenie*, dopełnione właściwymi spisami skrótów, kopiami publikacji oraz oświadczeniami współautorów prac.

W ocenianej pracy Recenzent znalazł tylko niewielkie błędy interpunkcyjne i stylistyczne. Zapewne tylko przez zapomnienie nie znalazłem informacji o zgodzie Komisji Bioetycznej na przeprowadzenie badań opublikowanych potem w czasopiśmie - dotyczy to artykułu nr 3.

Wniosek końcowy

Mimo przedstawionych wyżej uwag recenzowana rozprawa doktorska Pani lek. Anny Ruszały, który przedstawiła w cyklu 3 prac spełnia formalne wymogi stawiane kandydatom ubiegającym się o nadanie stopnia naukowego doktora nauk medycznych. Pragnę ponadto podkreślić, że przedstawione w nich wyniki badań mają niepodważalną wartość naukową. Uznanie recenzenta budzi duża wiedza, wnikliwość naukowa, umiejętność działania w zespołach badawczych, które pozwoliły na prawidłowo zaplanowane i przeprowadzone badania przy umiejętnym wykorzystaniu nowoczesnych metod badawczych w licznej własnej grupie chorych z zespołem Turnera. Wyniki badań Kandydatki mają także duże znaczenie praktyczne, ponieważ mogą przyczynić się do wcześniejszego rozpoznawania

mechanizmów zaburzeń, opracowania metod ich prewencji i leczenia oraz podniesienia jakości życia chorych dziewcząt i kobiet z zespołem Turnera. Przedstawiony cykl publikacji pod tytułem „Wybrane aspekty zaburzeń hormonalnych i metabolicznych u dziewcząt z zespołem Turnera” jako rozprawa doktorska Pani lek. Anny Ruszały odpowiada w pełni warunkom stawianym pracom na stopień doktora nauk medycznych.

Moim zdaniem przedstawiony mi do recenzji cykl publikacji spełnia wymogi stawiane rozprawie na stopień naukowy doktora nauk medycznych. Stawiam jej ogólnie dobrą ocenę i kieruję wniosek do Rady Dyscypliny Nauk medycznych Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie lekarz Anny Ruszały do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art.13 ust.1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule w zakresie sztuki (t.j. Dz.U. z 2017 r., poz. 1789).

Prof. dr hab. n.med. Artur Mazur