

Katowice, dnia 28 lipca 2023

Prof. dr hab. n. med. Ilona Kopyta

Katedra i Klinika Neurologii Dziecięcej

Wydział Nauk Medycznych w Katowicach

Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

40-752 Katowice, ul. Medyków 16

tel. 32 207 16 16

e-mail: ikopyta@sum.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej lek. Doroty Wesół- Kucharskiej pt.:

**„ Analiza stężenia czynnika wzrostu fibroblastów 21 u pacjentów z chorobą
mitochondrialną leczonych dietą ketogenną .”**

wykonana na wniosek Rady Naukowej Instytutu „Pomnik –Centrum Zdrowia Dziecka”



Wstęp

Choroby mitochondrialne (CM) są heterogenną grupą schorzeń, zaliczanych do wrodzonych wad metabolizmu, które wynikają z nieprawidłowej funkcji mitochondriów. Zazwyczaj mają one manifestację wielonarządową, a ich przebieg jest postępujący. W diagnostyce CM wykorzystuje się wiele biomarkerów, wśród których wymienia się m.in.: czynnik wzrostu fibroblastów 21 (FGF21), kwas mlekowy (LA), kwas pirogronowy (PA) czy alaninę (Ala) w surowicy. W chwili obecnej brak jest przyczynowego leczenia CM, a chorzy często wymagają wielospecjalistycznej opieki. Coraz więcej pojawia się w literaturze informacji o stosowaniu diety ketogennej (DK) w leczeniu pacjentów z chorobami mitochondrialnymi, ale jej skuteczność nie została jednoznacznie udowodniona.

Sumaryczna częstość występowania CM szacowana jest na 1,6:5000 żywych urodzeń, co czyni je najczęstszymi chorobami wśród wrodzonych wad metabolizmu. Odpowiednio współczynnik chorobowości wszystkich CM u dorosłych szacowany jest na około 12,5 na 100.000 mieszkańców a u dzieci do 16 roku życia: 4,7 na 100.000 mieszkańców. Zazwyczaj przebieg CM jest postępujący, z okresami zaostrzeń i remisji. Charakterystyczne jest nasilenie objawów w okresie infekcji, po wysiłku fizycznym czy w przebiegu różnego rodzaju stresu. Choroba może ujawnić się w każdym wieku – od wczesnego dzieciństwa (manifestacja pierwszych symptomów może być już wewnątrzłonowo) do późnej starości (> 65 r.ż.). Ponad jedna czwarta pacjentów z CM zaczyna chorować w okresie noworodkowym i niemowlęcym, wcześniejsze ujawnienie się choroby wiąże się z gorszym rokowaniem.

U dzieci najczęściej choroby mitochondrialne mają manifestację wielonarządową, a dominujące objawy wynikają z zajęcia OUN, wśród nich wyróżniamy: opóźnienie lub regresu w rozwoju psychoruchowym, zaburzenia dystrybucji napięcia mięśniowego, ataksję, mioklonie i inne incydenty napadowe. Padaczka jest istotnym problemem klinicznym wśród chorych z CM, gdyż napady zazwyczaj są trudne do leczenia, często pogarszają rozwój poznawczy i prowadzą do encefalopatii padaczkowej oraz wiążą się z gorszym rokowaniem. Ocenia się, że częstość występowania napadów padaczkowych wśród osób z CM wynosi 10 – 40%, ale wśród pacjentów pediatrycznych może nawet sięgać 60%. Charakterystyczne dla

dzieci z CM są także zaburzenia karmienia, niedobór masy ciała i wzrostu czy nawracające wymioty.

Z badań dodatkowych w diagnostyce CM powinno wykonać się neuroobrazowanie, optymalnie MRI OUN ze spektroskopią, które może wykazać: nieprawidłowy sygnał istoty białej, symetryczne hiperintensywne zmiany w sekwencji T2 i FLAIR w jądrach podstawy, wzgórzu i mózdzku, zanik mózgu i/lub zanik mózdzku lub zmiany udaropodobne, w zależności od jednostki chorobowej występującej u pacjenta. W spektroskopii MRI może pojawić się pik mleczanów. W tomografii komputerowej (TK) OUN mogą być obecne zwapnienia (szczególnie w jądrach podstawy) czy zmiany o typie SLE .

Pomocne w diagnostyce CM mogą być także badania elektrofizjologiczne: przewodnictwo nerwowo-mięśniowe (NCS), elektroencefalografia (EEG), elektrokardiografia (EKG), EKG metodą Holtera, echokardiografia (ECHO) serca. Należy również przeprowadzić pełne badanie okulistyczne i audiologiczne dla oceny analizatorów wzrokowego i słuchowego. Kluczowe w ustaleniu rozpoznania CM są badania molekularne, które niejednokrotnie są niezbędne do potwierdzenia choroby. Jednak diagnostyka ta w CM jest trudna z powodu dużej heterogenności genetycznej.

FGF21 jest białkiem produkowanym głównie przez wątrobę w odpowiedzi na stan przedłużonego głodzenia. Jego ekspresję obserwuje się również w innych tkankach – m.in. w tkance tłuszczowej, mięśniach szkieletowych, trzustce, komórkach endotelium serca czy w podwzgórzu; uważane jest za marker CM oraz progresji choroby, szczególnie w przypadku schorzeń przebiegających z zajęciem mięśni szkieletowych.

Dieta ketogenna(DK) jest to sprawdzonym i rekomendowanym sposobem leczeniem padaczki lekoopornej zarówno u dorosłych jak też u dzieci, w tym również u niemowląt. Liczne publikacje wskazują także na korzystny efekt DK u pacjentów z padaczką i CM, szczególnie u tych chorych, u których CM wynika z uszkodzenia I kompleksu łańcucha oddechowego.

Z opisanych powodów podjęcie badań mających na celu określenie skuteczności diety ketogennej dla przebiegu chorób mitochondrialnych oraz związek stosowania tej diety ze stężeniem FGF21 zasługuje na uznanie zarówno z uwagi na walory poznawcze, jak i

praktyczne. Powierzona mi do recenzji praca doktorska wpisuje się w aktualny nurt badawczy dotyczący diagnostyki i terapii schorzeń mitochondrialnych, jak również możliwości stosowania diety ketogennej przeżywającej aktualnie swój renesans.

Informacje o recenzowanej Pracy Doktorskiej

Rozprawa doktorska liczy 94 strony i ma układ typowy i właściwy dla pracy naukowej, uzupełniony o spis tabel i rycin, wykaz skrótów, a kolejno załączniki z informacjami na temat kryteriów rozpoznania choroby mitochondrialnej wg skali Nijmegen, oceny klinicznej podczas kwalifikacji dziecka do diety ketogennej, badań laboratoryjnych zleczanych na etapie VO, oceny klinicznej w czasie trwania badania, Międzynarodową Pediatriczną Skalę Zaawansowania Choroby (ang. International Paediatric Mitochondrial Disease Scale) oraz kwestionariusz dla Rodzica/ Opiekuna mający na celu ustalenie dolegliwości zgłaszanych przez dziecko, a także kartę badania fizykalnego i testów funkcjonalnych.

Wstęp zawiera 17 stron (strony od 11 do 28). Autorka przechodzi we Wstępie do omówienia kolejnych zagadnień, ważnych w aspekcie podjętego tematu pracy badawczej. Zakres i układ tej części pracy doktorskiej nie budzą zastrzeżeń, a poruszane problemy opisane są jasno i rzeczowo. Opracowany materiał może stanowić pomoc dla innych badaczy zainteresowanych podobną tematyką. Zakres tej części pracy wskazuje także na to, iż Doktorantka prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną adekwatną do podjętego zadania.

Cel pracy , zarówno główny jak i cele szczegółowe, został przedstawiony na stronie 29. Za główny cel pracy Doktorantka obrała ocenę skuteczności diety ketogennej u pacjentów z CM za pomocą FGF21. Cele szczegółowe dotyczą oceny stężenia FGF21 u pacjentów leczonych DK przed i w trakcie otrzymywania diety, analizy wybranych parametrów biochemicznych i klinicznych dzieci z CM leczonych DK oraz korelacja tych parametrów z wariantem genetycznym u danego pacjenta, a także ocena skuteczności i bezpieczeństwa DK u dzieci z CM. Doktorantka przedstawiła także zarówno hipotezę zerową(brak wpływu diety ketogennej na stężenie FGF21 u pacjentów z chorobą mitochondrialną) oraz hipotezę alternatywną o istnieniu związku pomiędzy stężeniem FGF21 a skutecznością stosowania diety u pacjentów z chorobą mitochondrialną. Hipotezy badawcze opisane są w sposób spójny i jasny, jakkolwiek sformułowanie celu głównego budzi pewne wątpliwości .



W rozdziale 3(Zastosowana metoda badawcza, s. 29) Doktorantka określa grupę badaną, która stanowią pacjenci hospitalizowani w Klinice Pediatrii, Żywienia i Chorób Metabolicznych IPCZD w Warszawie.

Pacjenci byli rekrutowani do 4 grup:

Gr. 1: Pacjenci z chorobą mitochondrialną, u których włączono leczenie dietą ketogenną (grupa badana, n = 14).

Gr. 2: Pacjenci z chorobą mitochondrialną pozostający na zwykłej diecie (grupa kontrolna, n = 21).

Gr. 3: Pacjenci bez choroby mitochondrialnej, u których włączono leczenie dietą ketogenną z innych wskazań (grupa kontrolna, n = 11).

Gr. 4: Pacjenci bez choroby mitochondrialnej pozostający na zwykłej diecie, bez diety ketogennej (grupa kontrolna, n = 17).

Doktorantka informuje kolejno, że dzieci z CM z chorobą mitochondrialną były w sposób losowy przydzielane do Gr1.(leczenie DK) lub Gr.2(bez DK), za wyjątkiem chorych z prawdopodobnym lub potwierdzonym deficytem dehydrogenazy kwasu pirogronowego (PDHD). Ten sposób przydziału pacjentów musi budzić wątpliwości, o czym w końcowej części recenzji.

Kolejno Doktorantka określa Kryteria włączenia(dzieci w wieku od 4 tygodnia do ukończonego 18 roku życia i rozpoznana lub prawdopodobna choroba mitochondrialna) oraz Kryteria wyłączenia wraz z opisem zaburzeń, które stanowią przeciwwskazanie do zastosowania diety ketogennej.

Projekt badania, a także formularze świadomej zgody dla pacjentów i ich rodziców/przedstawicieli ustawowych, zyskały pozytywną opinię Komisji Bioetycznej IPCZD (nr: 40/KBE/2019).

W pracy zastosowano metody statystyczne odpowiednie do celu badania i rodzaju zbiorowości statystycznej.

Wyniki (rozdział 4, strony 33-55) to część pracy, w której Doktorantka charakteryzuje najpierw badaną grupę. Czas rekrutacji pacjentów trwał 16 miesięcy, a kolejno przez okres 12 miesięcy prowadzono obserwacje pacjentów. Ostatecznie spośród rekrutowanych 63 dzieci badanie ukończyło 42, z czego dzieci z chorobą mitochondrialną – 21. Zważywszy na częstość występowania schorzeń mitochondrialnych badana grupa jest stosunkowo duża. Po dokonaniu jednak podziału na założone wstępnie podgrupy badani po 10-11 dzieci w każdej z nich. Zwraca uwagę także fakt, iż dzieci bez diety ketogennej (Gr. 2 oraz Gr.4) były młodsze od dzieci leczonych dietą (gr .1 i Gr. 3)(vide tabela 7). Grupę 1 (n=11) stanowili pacjenci z chorobą mitochondrialną, którzy wylosowani zostali do leczenia dietą ketogenną. Wśród nich sześć osób miało stwierdzony (potwierdzony w badaniu molekularnym) deficyt dehydrogenazy kwasu pirogronowego (PDHD) – chorzy ci byli włączeni do leczenia DK bez losowania. Pacjenci mieli potwierdzoną CM badaniem genetycznym – poza patogennym wariantem w genie *PDHA1* (n=6), stwierdzono warianty w mtDNA (n=3) i w nDNA (n=2).

U wszystkich pacjentów w grupie 1 włączono leczenie DK na wizycie V0. Troje dzieci przerwało leczenie z powodu występujących działań niepożądanych DK: ostrego zapalenia trzustki (pacjent 1.1, po 13 miesiącach leczenia), stłuszczenia wątroby oraz braku akceptacji diety (pacjentka 1.7, po 5 miesiącach leczenia) oraz z powodu uporczywych wymiotów (pacjent 1.8, po 8 miesiącach leczenia). Dodatkowo, pacjentka 1.7 nie odniosła żadnej korzyści ze stosowanego leczenia. Pozostałe osoby DK tolerowały dobrze.

W trakcie włączanie DK u chorych z grupy 1 (pacjenci z CM) pięcioro miało rozpoznaną i leczoną padaczkę, ale tylko u dwóch pacjentów występowały napady padaczkowe. W trakcie leczenia DK uzyskano u jednego pacjenta całkowite ich ustąpienie, a u kolejnego znaczne ich zmniejszenie (o 50 – 90%). Dodatkowo u dwóch z pięciu pacjentów leczonych przeciwpadaczkowo było możliwe odstawienie leków przeciwpadaczkowych.

Poprawę w rozwoju psychoruchowym i funkcjonowaniu pacjentów (raportowane przez opiekunów oraz stwierdzone na podstawie badania przedmiotowego, w tym również badania neurologicznego) w trakcie leczenia DK obserwowano zarówno w grupie chorych z CM (trzech z pięciu pacjentów), jak też w grupie chorych bez CM (u dwóch z dziewięciu chorych), jednak parametry te nie były mierzone w wystandaryzowany sposób. Istotną statystycznie różnicę zaobserwowano w zakresie poprawy napięcia mięśniowego, która

częściej była obserwowana w gr. 1 niż gr. 3 ($p < 0,05$). Zmniejszenie ruchów dodatkowych (drżenia, ataksji czy ruchów dystonicznych) częściej obserwowano u chorych leczonych DK z CM niż u chorych bez CM, ale nie była to różnica istotna statystycznie ($p = 0,5402$).

Jakkolwiek uzyskanie redukcji ilości napadów padaczkowych bądź też ich całkowite ustąpienie stanowi mierzalny i obiektywny wskaźnik skuteczności diety ketogennej, to ocena napięcia mięśniowego czy też (cyt.) „poprawa w funkcjonowaniu pacjentów” oraz poprawa w zakresie ruchów mimowolnych bez obiektywizacji tego wyniku odpowiednią skalą budzi zastrzeżenia.

Kolejno porównano występujące objawy kliniczne u pacjentów z CM leczonych i nieleczonych DK (Gr. 1 vs Gr. 2). Różnica w zmianie punktacji IPMDS w gr. 1 vs. gr. 2 była istotna statystycznie ($p = 0,0048$) na korzyść grupy leczonej DK.

Wśród pacjentów leczonych DK (Gr. 1) wyszczególniono osoby z deficytem dehydrogenazy kwasu pirogronowego (PDHD) ($n = 6$). Każdy chory z PDHD odniósł korzyść z włączenia DK, głównie w zakresie poprawy napięcia mięśniowego, zmniejszenia liczby ruchów dodatkowych oraz poprawy tolerancji wysiłku. U nikogo z tym rozpoznaniem nie przerwano leczenia DK. Porównanie korzyści wynikające z DK u pacjentów z PDHD w stosunku do chorych z inną niż PDHD CM ($n = 5$) jest w badanej grupie trudne, z powodu małej liczebności podgrup.

W zakresie analizowanych parametrów biochemicznych najwyższe wartości FGF21 obserwowano w grupie pacjentów z nieprawidłowym wariantem w mtDNA, natomiast w grupie chorych z PDHD stężenie FGF21 było porównywalne do grupy kontrolnej. Porównano również powyższe biomarkery w grupie osób z CM leczonych (gr. 1) i nieleczonych DK (gr. 2).

Mediana stężenia FGF21 w obu grupach obniżyła się w czasie obserwacji, wynik jednak nie osiągnął znamienności statystycznej. Nie było istotnej zmiany w ocenie aktywności kinazy kreatynowej w gr. 1 ani w gr. 2 w czasie obserwacji.



W Dyskusji(strony 56-62) Doktorantka konfrontuje swoje wyniki z danymi literaturowymi, umiejętnie poruszając się w piśmiennictwie w zakresie tematu podjętego badania. Doktorantka omawia w kolejnych podrozdziałach wpływ diety ketogennej na przebieg choroby u pacjentów z dieta ketogenną, działania niepożądane diety oraz parametry biochemiczne mające zastosowanie w diagnostyce oraz monitorowaniu przebiegu chorób mitochondrialnych.

Na podstawie wyników, Doktorantka sformułowała sześć wniosków (w Wnioski,s. 62), pozostających w spójności z założonymi celami pracy, po części jednak stanowiących powielenie treści zawartych w Wynikach..

Kolejny rozdział to Piśmiennictwo- 126 pozycji , w tym w zdecydowanej większości publikacje , które ukazały się w ciągu ostatnich lat. Pozycje piśmiennictwa właściwie dobrane do potrzeb rozważań Doktorantki.

W podsumowaniu recenzji warta wyeksponowania jest dociekliwość Doktorantki w zakresie wybranych do oceny zadań. Dyskusji jednak wymagają poniższe kwestie, w tym merytoryczna.

1/ Przydział dzieci z CM do grupy leczonych lub nieleczonych DK po części losowo, a po części -celowo (w przypadku dzieci, u których istnieje wysokie prawdopodobieństwo odniesienia korzyści ze stosowania diety ketogennej) musi nasuwać wątpliwości szczególnie, że cała grupa dzieci z CM leczonych DK to 14 pacjentów, a dzieci z PDHD- to 6 pacjentów z tej grupy. Istnieje więc prawdopodobieństwo wpływu doboru tej grupy na uzyskane wyniki. Uważam, więc ,że ta kwestia powinna być przez Doktorantkę wyjaśniona szczegółowo w pracy i ostrożnie skomentowana w odniesieniu do jej celowości oraz interpretacji wyników. Natomiast planując publikację uzyskanych wyników badań, które niewątpliwie zasługują na zaprezentowanie w prasie naukowej, wskazane będzie poszerzenie grupy badanej leczonej DK oraz nieleczonej.

2/ Doktorantka opisuje korzyści z zastosowania diety ketogennej u dzieci z Gr. 1, a więc ustąpienie lub redukcję ilości napadów u 2 dzieci, a także poprawę napięcia mięśniowego czy też (cyt.) „poprawę w funkcjonowaniu pacjentów” oraz poprawa w zakresie ruchów mimowolnych .

W całej Gr. 1 jedynie 2 dzieci miało napady podczas ich rekrutacji i prowadzenia badania, wobec czego ustąpienie bądź redukcja ilości napadów stanowi obiektywny i mierzalny efekt terapii; podobna uwaga dotyczy dzieci, u których odstawiono leki przeciwpadaczkowe, i, jak wnioskuję z dalszego toku rozprawy, podczas 12 miesięcznej obserwacji nie było konieczności ponownego ich wdrażania z powodu nawrotu napadów. Ostatecznie jednak wnioski oparte są o wyniki uzyskane u pojedynczych dzieci, co w mojej ocenie wymaga opatrzenia wniosków/ tytułu pracy jako doniesienia wstępnego. Wspomniany skutek stosowania DK pod postacią subiektywnie ocenionej poprawy napięcia czy też „lepszego funkcjonowania” wymagałby obiektywizacji, a co za tym idzie- dłuższej niż 12 miesięcznej obserwacji pacjentów, co też rekomendowałabym Doktorantce. Ponadto warto byłoby podjąć próbę oceny z czego wynika wspomniana poprawa funkcjonowania- czy jest efektem korzystnego oddziaływania diety jako takiej czy też może wynika z redukcji/ ustąpienia napadów.

3/ Wyjaśnienia wymaga także koncepcja dołączenia dwóch kolejnych grup, to jest dzieci bez CM leczonych DK i nieleczonych. Z racji braku CM pacjenci z tych grup (odpowiednio 3 i 4) będą różnić się pod wieloma względami, w tym- pod względem stężenia/ aktywności markerów charakterystycznych dla CM; podobnie odpowiedź tych dzieci na DK, z racji różnic metabolicznych, musi być różna. Doktorantka wskazuje także, iż poprawę w rozwoju psychoruchowym i funkcjonowaniu pacjentów (raportowane przez opiekunów oraz stwierdzone na podstawie badania przedmiotowego, w tym również badania neurologicznego) w trakcie leczenia DK obserwowano zarówno w grupie chorych z CM (Gr. 1 ; trzech z pięciu pacjentów), jak też w grupie chorych bez CM (Gr3; u dwóch z dziewięciu chorych), jednak parametry te nie były mierzone w wystandaryzowany sposób. Ponownie-grupa 1 to dzieci z CM, co w obrazie klinicznym oznacza hipotonię pochodzenia ośrodkowego bądź obwodowego, natomiast dzieci z Gr. 3- to dzieci z niedowładem spastycznym ewentualnie cechami zespołu pozapiramidowego. Różnice więc w zakresie tych grup, przyczyn niepełnosprawności i obrazu klinicznego są więc znaczne, co sprawia, że ich porównywanie budzi wątpliwości.

Ponadto w Celach pracy oraz w hipotezach badawczych Doktorantka w żaden sposób nie odnosi się do tych właśnie grup (3 i 4) pacjentów włączonych do badania. Jakkolwiek

Doktorantka uzyskała odpowiedzi na postawione cele , to jednak kwestia ta i zasadność takiego rekrutowania pacjentów wymaga wyjaśnienia.

4/ Wniosek b (cyt. „ Dieta ketogenna może być rozważana jako opcja terapeutyczna u chorych z CM, szczególnie u tych, u których występują napady padaczkowe. Wykazano, że takie leczenie może przynieść poprawę stanu klinicznego pacjentów z CM, pozwala opanować napady padaczkowe i spowolnić postęp CM.”) wymaga modyfikacji- liczebność grupy oraz czas obserwacji nie uprawniają do tak stanowczych stwierdzeń zwłaszcza w odniesieniu do przebiegu chorób o postępującym charakterze.

5/ W pracy występują dość liczne błędy edytorskie i literowe, nie wpływają one jednak na czytelność przekazywanych treści.

W podsumowaniu recenzji na podkreślenie zasługuje nowatorski charakter badań podjętych przez Doktorantkę oraz wyzwanie, jakim jest zgromadzenie grupy dzieci z rzadkimi schorzeniami, jakimi są choroby mitochondrialne. Brak możliwości zaproponowania tym pacjentom leczenia celowanego stanowi także o wadze podjętego przez Doktorantkę zadania. Problem poruszony przez Doktorantkę jest istotny i ma interdyscyplinarny charakter. Doceniam praktyczny walor przeprowadzonych przez Doktorantkę badań, jej wiedzę teoretyczną oraz zaangażowanie w przeprowadzone badania.

Ogólna ocena rozprawy doktorskiej lek. Doroty Wesół- Kucharskiej jest **pozytywna**. Praca jest nowoczesnym i oryginalnym przedsięwzięciem zmierzającym do rozwiązania konkretnego zadania, jakim jest ocena wpływu DK na przebieg kliniczny CM, w tym – jej wpływu na stężenie wybranego markera biochemicznego. Doceniam praktyczny walor przeprowadzonych przez Doktorantkę badań, a także wkład w postępy w zakresie diagnostyki tych rzadkich schorzeń w Polsce.

Recenzowana przeze mnie 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 naukowych i tytule naukowym w zakresie sztuki (Załącznik do obwieszczenia Marszałka Sejmu RP z dnia 2 grudnia 2014r.-Dz.U.poz. 1852). Wobec powyższego mam zaszczyt przedstawić Radzie Naukowej Instytutu „ Pomnik- Centrum Zdrowia Dziecka” wniosek o dopuszczenie lek. Doroty Wesół -Kucharskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.