

Rzeszów 5.11.2021r

**RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

Lek. Katarzyna Pasternak-Pietrzak

**„OCENA CZYNNIKÓW PROGNOSTYCZNYCH NAWROTU CHOROBY I JAKOŚCI ŻYCIA  
PACJENTÓW Z CHOROBAŁ CUSHINGA W MATERIALE OŚRODKA INSTYTUT „POMNIK  
- CENTRUM ZDROWIA DZIECKA”**

Wiodącym tematem w pracy badawczej lek med. Katarzyny Pasternak-Pietrzak były badania nad chorobą Cushinga u dzieci, który jest poważnym wielodyscyplinarnym problemem diagnostycznym i leczniczym. U dzieci objawy kliniczne tej choroby rozwijają się powoli, podstępnie i zależą od wieku dziecka, stopnia nasilenia hiperkortyzolemii (postać subkliniczna lub jawna), od charakteru wydzielania kortyzolu (stały lub cykliczny) oraz od występowania hiperandrogenemii i nadmiaru mineralokortykosteroidów. Niezwykle ważna jest diagnostyka różnicowa, konieczna do postawienia właściwej diagnozy i leczenia.

Z punktu widzenia pacjenta/-tki i jej rodziny rozpoznanie choroby Cushinga stanowi osobistą tragedię a występujące liczne zaburzenia, i ich powikłania są także wieloaspektowym problemem społecznym. Standardy postępowania dotyczące diagnostyki i leczenia opierają się głównie na doświadczeniach z populacji dorosłych. Niewiele ośrodków na świecie ma doświadczenie w leczeniu pacjentów z tą chorobą. Tym większa jest wartość badań podjętych przez lek. med. Katarzynę Pasternak-Pietrzak zakończonych cyklem prac pod tytułem „OCENA CZYNNIKÓW PROGNOSTYCZNYCH NAWROTU CHOROBY I JAKOŚCI ŻYCIA PACJENTÓW Z CHOROBAŁ CUSHINGA W MATERIALE OŚRODKA INSTYTUT

„POMNIK - CENTRUM ZDROWIA DZIECKA” 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 Wstępu, w którym w kolejnych częściach Doktorantka wprowadzają czytelnika w aktualny przegląd zagadnień związanych z tematyką pracy takich jak: etiologia, epidemiologia, diagnostyką i leczenie pacjentów z chorobą Cushinga w populacji wieku rozwojowego. Dane przedstawione we Wstępie zostały doskonale rozwinięte i poszerzone w pierwszych dwóch pracach cyklu - o charakterze poglądowym opublikowanych w czasopismach z listy filadelfijskiej. Były to:

*Paediatric Cushing's disease - a literature review of epidemiology, pathogenesis, clinical symptoms, and diagnostics.* Pasternak-Pietrzak K, Moszczyńska E, Jurkiewicz E., Szalecki M. Endokrynol Pol 2020; 71: 87-95 [doi: 10.5603/EP.a2019.0040](https://doi.org/10.5603/EP.a2019.0040) (Wskaźnik Impact Factor: 1.322, Punktacja MEiN:40) oraz *Treatment challenges in pediatric Cushing's disease: Review of the literature with particular emphasis on predictive factors for the disease recurrence.* Pasternak-Pietrzak K, Moszczyńska E, Szalecki M. Endocrine 2019; 66: 125-136.(Wskaźnik Impact Factor: 3.235, Punktacja MEiN:100).

Cykl prac, na podstawie którego powstała rozprawa doktorska składa się z 6 spójnych tematycznie artykułów: w tym wspomniane już 2 o charakterze poglądowym i 4 o charakterze oryginalnym.

W przedstawionym cyklu pracy - przedstawiono następujące prace oryginalne:

- *Long-term outcome in patients after treatment for Cushing's disease in childhood*, Katarzyna Pasternak-Pietrzak, Elżbieta Moszczyńska, Marcin Roszkowski, Karolina Kot, Elżbieta Marczak, Wiesława Grajkowska, Maciej Pronicki, Mieczysław Szalecki PLOS ONE 2019; 14: e0226033  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226033> (Wskaźnik IF: 2.740, Punktacja MEiN: 100),
- *Predictive factors for the recurrence of Cushing's disease after surgical treatment in childhood*, Katarzyna Pasternak-Pietrzak; Elżbieta Moszczyńska; Marcin Roszkowski; Mieczysław Szalecki Endokrynol. Pol. 2020; 71: 313-318  
<http://dx.doi.org/10.5603/EP.a2020.0026> (Wskaźnik IF: 1.322 ,Punktacja MEiN: 40),
- *Is there a common cause for pediatric Cushing's disease?* Katarzyna Pasternak-Pietrzak, Fabio Rueda Faucz, Constantine A Stratakis, Elżbieta Moszczyńska, Marcin Roszkowski, Wiesława Grajkowska, Maciej Pronicki, Mieczysław Szalecki Endokrynol. Pol. 2021; 73: 104-107 DOI: [10.5603/EP.a2020.0073](https://doi.org/10.5603/EP.a2020.0073) (Wskaźnik IF: 1.322, Punktacja MEiN: 40),
- *The quality of life in adult patients treated for Cushing's disease in childhood.* Pasternak-Pietrzak K, Moszczyńska E, Szalecki M. Pediatr Endocrinol, Diabetes Metab 2021; 27(2): 93-99 DOI: <https://doi.org/10.5114/pedm.2021.107163> (Punktacja MEiN: 40).

Wszystkie artykuły zostały opublikowane w recenzowanych czasopismach medycznych, indeksowanych w bazie PubMed, o łącznym wskaźniku oddziaływania (*impact factor, IF*) 9,41 i punktacji MEiN wynoszącej 360 pkt. Zgodne oświadczenia współautorów wskazują na to, że wkład Kandydatki zarówno w opracowanie koncepcji pracy, wykonanie i opracowanie badań, a także analizy, i dyskusji otrzymanych wyników był dominujący, i znaczący. Doktorantka jest pierwszym autorem wszystkich 6 prac, wartość naukowa zawartych w rozprawie doniesień nie pozostawia wątpliwości. 5 z nich zostało opublikowanych 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 29 pacjentów z Chorobą Cushinga (15 dziewcząt i 14 chłopców) Instytutu „Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka” (IPCZD) leczonych w latach 1994-2018. Leczenie neurochirurgiczne 24 pacjentów przeprowadzono w Klinice Neurochirurgii IPCZD, u pozostałych 5 pacjentów – w innych ośrodkach. Średni czas obserwacji wyniósł 10.23 lat (0.67-24.50). Dobór publikacji układa się w logiczną całość.

Wyznaczonymi celami przedstawionego cyklu prac były :

1. Długoterminowa ocena pacjentów Instytutu „Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka” (IPCZD) po leczeniu CD w dzieciństwie.
2. Identyfikacja czynników predykcyjnych nawrotu CD u pacjentów po leczeniu neurochirurgicznym w dzieciństwie.
3. Analiza częstości występowania somatycznych zmian patogennych w genie *USP8* w grupie pacjentów leczonych z powodu CD w IPCZD.

#### 4. Ocena jakości życia dorosłych pacjentów po leczeniu CD w dzieciństwie.

Dane przedstawione w cyklu prac uzyskano dzięki analizie retrospektywnej. Wszyscy pacjenci poza jednym zostali przyjęci do Kliniki Endokrynologii IPCZD przed operacją neurochirurgiczną. Analizy stanu zdrowia pacjentów dorosłych (byłych pacjentów IPCZD) dokonano za pomocą ankiety własnej (zawierającej pytania m.in. o nawrót choroby, stosowane aktualnie leki czy choroby współistniejące) wypełnionej przez poszczególnego pacjenta. Odpowiedzi uzyskano drogą korespondencyjną, telefonicznie lub elektronicznie i były one weryfikowane przez lekarza przeprowadzającego badanie. Osiemnastu spośród 24 dorosłych pacjentów odpowiedziało na ankietę (współczynnik odpowiedzi wyniósł 75%). Analizę stanu zdrowia pacjentów, którzy nie odpowiedzieli na ankietę, zakończono na ostatniej wizycie w IPCZD. W przypadku 1 pacjenta nie udało się przeprowadzić obserwacji po operacji neurochirurgicznej. Długoterminowej analizy stanu zdrowia pacjentów będących aktualnie pod opieką IPCZD dokonano na podstawie danych z ostatniej wizyty. W celu przedstawienia wyników potwierdzonych przez ocenę kliniczną, długoterminowa analiza 27 (93%) pacjentów została dokonana na podstawie danych z ostatniej oceny w IPCZD. Długoterminową remisję zdefiniowano jako konieczność substytucji glikokortykosteroidami lub poprzez kliniczne lub biochemiczne dowody normokortyzolemii (poranny kortyzol w surowicy w zakresie 5-25 µg/dl lub prawidłowy wynik wydalania dobowego kortyzolu w moczu lub 17-OHCS).

Analizę czynników predykcyjnych nawrotu choroby, Kandydatka przeprowadziła po ustaleniu dwóch punktów czasowych, w których zakończono obserwację pacjentów.

Pierwszy punkt czasowy (krótsza obserwacja (FU), 24 pacjentów) ustalono, gdy pacjenci

zakończyli leczenie w IPCZD. Drugi punkt czasowy (dłuższa obserwacja, 26 pacjentów) ustalono na podstawie czasu jaki upłynął od operacji do momentu wypełnienia ankiety przez dorosłego pacjenta (byłego pacjenta IPCZD).

Analizę genetyczną częstości występowania zmian patogennych w genie *USP8* w grupie dzieci i młodzieży z CD przeprowadzono u 18 pacjentów. Badania genetyczne przeprowadzono w the National Institutes of Health, Bethesda w Stanach Zjednoczonych. Próbkę guzów zostały zanonimizowane, aby nie ujawniać danych osobowych ośrodkowi przeprowadzającemu badanie. Materiałem genetycznym była usunięta podczas operacji tkanka guza zabezpieczona w postaci bloków parafinowych.

Jakość życia 18 dorosłych pacjentów oceniono za pomocą krótkiej wersji kwestionariusza jakości życia Światowej Organizacji Zdrowia (WHOQoL-BREF) i przeanalizowano wpływ wybranych czynników prognostycznych na jakość życia pacjentów. Wyniki porównano z grupą kontrolną osób zdrowych w tym samym wieku i płci.

Uzyskane dane Kandydatka poddała przemyślanej i doskonale dobranej i wykonanej analizie statystycznej, która obejmowała między innymi badanie rozkładu zmiennych ciągłych, które sprawdzono pod kątem normalności. W przypadku rozkładu normalnego do określenia istotnych statystycznie różnic zastosowano test t-Studenta. Do porównania grup, w których nie uzyskano rozkładu normalnego, użyto testu Manna-Whitney'a. Testu dokładnego Fischera, testu Z dla jednej proporcji oraz testu Z dla dwóch proporcji dla małych prób użyto do porównania grup, w których sprawdzane zmienne wyrażono w skali dychotomicznej. Istotność statystyczną przyjęto, gdy  $P < 0.05$ . Dane analizowano za pomocą programu Statistica 13.0 PL dla Windows. Czynniki predykcyjne nawrotu choroby

analizowano za pomocą modelu regresji logistycznej oraz krzywej ROC (ang. *receiver operating characteristics*). Analizowanymi zmiennymi były: płeć, wiek w momencie wystąpienia objawów choroby, wiek w momencie operacji, różnica pomiędzy wiekiem podczas operacji a wiekiem w momencie wystąpienia objawów, średnie poranne stężenie kortyzolu przed leczeniem, średnie stężenie kortyzolu w nocy, maksymalne stężenie ACTH przed leczeniem, maksymalne stężenie ACTH po teście stymulacyjnym z owczą kortykoliberyną (oCRH) (przed operacją transfenoidalną), czas substytucji hydrokortyzonem (po operacji), zobrazenie gruczołka w rezonansie magnetycznym, naciekanie zatoki skalistej lub opony twardej i potwierdzenie gruczołka w badaniu histopatologicznym.

Zgodę na przeprowadzenie badania i publikację wyników wydała Komisja Bioetyczna (48/KBE/2018 i 10/KBE/2019) działająca przy IPCZD .

W przedstawionych pracach oryginalnych Doktorantka wykazała, że średni wiek w momencie początku choroby (definiowanym jako moment wystąpienia pierwszych objawów) wyniósł 10.20 lat (mediana wieku 10.80 lat, zakres 4.33-16.00). Dwudziestu trzech z dwudziestu ośmiu (83%) pacjentów uzyskało biochemiczną remisję po pierwszym zabiegu transfenoidalnym (pooperacyjne stężenie kortyzolu  $<1.8 \mu\text{g/dl}$ ), a 2/28 (7%) pacjentów po drugiej operacji transfenoidalnej przysadki. Całkowity wskaźnik uzyskania remisji po operacjach neurochirurgicznych wyniósł 89%. Jeden pacjent nie został włączony do analizy po zabiegu neurochirurgicznym z powodu braku obserwacji. Wskaźnik remisji po pierwszym TSS (TSS<sub>1</sub>) wykonanej przez tego samego neurochirurga z IPCZD wyniósł 83.3% (20/24 pacjentów), po drugim TSS (TSS<sub>2</sub>) 8.33% (2/24 pacjentów), łącznie 91.67%.



W momencie ostatniej obserwacji: 18 pacjentów (62%) uzyskało długoterminową remisję po TSS<sub>1</sub>, 2 pacjentów (6.9%) po TSS<sub>2</sub>, 1 pacjent (3.4%) po radioterapii przeprowadzonej po zabiegach neurochirurgicznych, a 3 pacjentów (10.3%) po obustronnej adrenalektomii. Jeden pacjent (3.4%) zmarł na skutek komplikacji pooperacyjnych po TSS<sub>2</sub>, jeden pacjent (3.4%) miał chorobę przetrwałą, u 1 pacjenta (3.4%) nie udało się przeprowadzić długoterminowej obserwacji. Nawrót choroby wystąpił u 4 z 28 pacjentów (14%) w średnim czasie 3.6 lat od skutecznego leczenia. Jeden pacjent (3.4%) był operowany z powodu zespołu Nelsona, który wystąpił po obustronnej adrenalektomii. Dwóch pacjentów (6.9%) miało podejrzenie nawrotu choroby na koniec obserwacji. W momencie ostatniej oceny: 17 pacjentów (63%) było leczonych lewotyroksyną od momentu skutecznego leczenia, 16 pacjentów (59%) stosowało leczenie hydrokortyzonem, 10 pacjentów (37%) stosowało hormonalną terapię zastępczą, 4 pacjentów (15%) – desmopresynę. Na podstawie danych z ostatniej oceny klinicznej w IPCZD, niedoczynność przysadki w zakresie tyreotropiny stwierdzono u 73.9% pacjentów, w zakresie adrenokortykotropiny u 56.2% pacjentów, gonadotropin u 43.4%, a hormonu antydiuretycznego u 21.7% pacjentów.

W przedstawionych pracach w cyklu nie stwierdzono czynników predykcyjnych nawrotu choroby Cushinga na poziomie istotności statystycznej  $P < 0.05$ . Biorąc pod uwagę dłuższy FU, dwa czynniki: średnie stężenie kortyzolu w nocy i max. stężenie ACTH po teście z CRH były najbliższej ( $P = 0.10$ ) poziomu istotności statystycznej. Stwierdzono istotną wartość progową ( $P < 0.001$ ) średniego kortyzolu w surowicy w nocy a najlepsza wartość odcięcia dla rozróżnienia remisji i nawrotu wyniosła 17.5 µg/dl (czułość 70%, swoistość 100%), pole pod krzywą ROC (AUC) wyniosło 0.81. Wykryto, że stężenie ACTH poniżej 98 pg/ml (po teście z oCRH)



stanowiło najlepszą wartość odcięcia rozróżniającą pacjentów z długoterminową remisją od pacjentów z nawrotem choroby (czułość 63.2%, swoistość 100%,  $P=0.07$ ,  $AUC=0.70$ ).

Uwagę recenzenta wzbudziły również przeprowadzone wspólnie z partnerami z USA unikalne badania genetyczne materiałów z badan histopatologicznych. W żadnej z próbek zbadanych genetycznie nie wykazano wariantu patogennego w znanym regionie hotspot genu *USP8*. W regionie tym zidentyfikowano jeden rzadki synonimiczny wariant (c.2154C>T / p.Ser718= / rs1261832527 / 0.0007%). Wokół obszaru hotspot genu *USP8* zidentyfikowano także nowy wariant typu *missense* (przewidywany jako łagodny przy użyciu narzędzia PolyPhen in silico - <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>): wariant p.Thr723Ile utworzony przez przejście w pozycji 2168 C na T (c.2168C>T).

W przeprowadzonej przez Doktorantkę analizie jakości życia, uczestnicy (10 kobiet i 8 mężczyzn) byli w średnim wieku 28.93 lat (19.75-40.33). Nie stwierdzono istotnej różnicy w QoL między analizowanymi pacjentami a grupą kontrolną. U pacjentów z niedoczynnością przysadki wykazano niższe wyniki w domenie 4 (środowisko funkcjonowania) w porównaniu z pacjentami bez niedoczynności przysadki ( $P = 0.31$ ) oraz niższe wyniki w domenie 2 (dziedzina psychologiczna) w porównaniu z grupą kontrolną ( $P = 0.045$ ). U pacjentów starszych w momencie wystąpienia choroby stwierdzono niższe wyniki QoL w domenie 1 (zdrowie fizyczne) ( $P = 0.031$ ).

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

- Nawrót choroby Cushinga może wystąpić nawet po długim czasie od skutecznego leczenia.
- Długoterminowa obserwacja pacjentów po leczeniu choroby Cushinga w dzieciństwie wskazuje na obecność deficytów hormonalnych u znacznej liczby pacjentów, co może być spowodowane bardziej rozległą operacją przysadki skutkującą wysokim wskaźnikiem remisji. Ponadto, analizowany materiał pochodzi z długiego okresu, kiedy dostępność metod diagnostycznych (np. cewnikowanie zatok skalistych) i techniki operacyjne nie były idealne, szczególnie u pacjentów z pierwszych lat analizy.
- Istnieje możliwość, że średnie stężenie kortyzolu w nocy oraz wartości ACTH w teście z oCRH wykonanym przed TSS mogą być pomocne jako predyktory nawrotu choroby po skutecznym leczeniu. Dalsze badania na większej próbie pacjentów są potrzebne, aby potwierdzić tę hipotezę.
- Prezentowane badanie dowodzi, że warianty patogenne w genie *USP8* mogą nie być powszechną przyczyną choroby Cushinga w badanej populacji dzieci i młodzieży. Wiedza o molekularnym podłożu gruczolaków kortykotropowych przysadki wciąż nie jest do końca poznana.
- W długoterminowej ocenie QoL pacjentów po leczeniu CD w dzieciństwie nie różni się istotnie od QoL osób zdrowych w tym samym wieku i płci. Niezbędne są dalsze badania, aby poszerzyć wiedzę na temat czynników, które mogą wpływać na jakość życia pacjentów z CD leczonych w dzieciństwie.



Szczególne uznanie recenzenta wzbudziły dyskusje w prezentowanych pracach oryginalnych cyklu , w których Doktorantka konfrontuje błyskotliwie uzyskane przez siebie wyniki badań, zestawiając je w kontrpropozycjach do osiągnięć najważniejszych badaczy z omawianego tematu, publikujących zarówno w Polsce jak i na całym świecie. Podkreślić należy swobodę i łatwość zestawiania kluczowych problemów, wynikających z oceny uzyskanych w rozprawie wyników z opiniami innych autorów.

W ocenianej pracy Recenzent znalazł tylko niewielkie błędy interpunkcyjne i stylistyczne . Wartość pracy byłaby jeszcze większa gdyby analizy stanu zdrowia pacjentów dorosłych (byłych pacjentów IPCZD), dokonano przy uż jakiego wystandaryzowanego i zwalidowanego kwestionariusza.

### **Wnioski końcowe**

Mimo przedstawionych wyżej uwag recenzowana rozprawa doktorska Pani Katarzyny Pasternak , który przedstawiła w cyklu 6 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 chorobą Cushinga. Wyniki badań Kandydatki mają także duże znaczenie praktyczne, ponieważ mogą przyczynić się do wcześniejszego rozpoznawania poznania mechanizmów zaburzeń, opracowania metod ich prewencji i leczenia oraz podniesienia



jakości życia pacjentów z chorobą Cushinga. Przedstawiona rozprawa doktorska Pani Katarzyny Pasternak odpowiada w pełni warunkom stawianym pracom na stopień doktora nauk medycznych, dlatego wnioskuję o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów obrony pracy doktorskiej oraz jej wyróżnienie, według stosownych wymagań i przepisów prawa.

*Artur Mazur*