

Ocena rozprawy doktorskiej lek. Magdaleny Naorniakowskiej „Choroba Wilsona w polskiej populacji dzieci - obraz kliniczny, histopatologiczny, diagnostyka różnicowa i podłoże genetyczne”.

Rozprawa doktorska lek. Magdaleny Naorniakowskiej dotyczy klinicznie istotnego problemu jakim jest choroba Wilsona (WD). Choroba Wilsona jest chorobą uwarunkowaną genetycznie, dziedziczną w sposób autosomalnie recesywny, występującą z częstością 1:30000, spowodowaną zaburzeniem metabolizmu miedzi. Mutacja błonowego białka ATP (kodowanego przez gen *ATP7B* - chromosom 13) wiążącego miedź prowadzi do upośledzenia jej wydzielania z hepatocytów do żółci i zaburzenia wiązania z ceruloplazminą. W następstwie czego ma miejsce odkładanie się miedzi w różnych tkankach i narządach - przede wszystkim w wątrobie i ośrodkowym układzie nerwowym, rzadziej w obrębie nerek, układu krążenia i/lub układu kostnowątkowego. W populacji pediatrycznej zdecydowanie dominuje postać wątrobowa, której najczęstszą manifestacją jest bezobjawowe podwyższenie aktywności aminotransferaz w surowicy krwi. Wczesne postawienie prawidłowego rozpoznania oraz włączenie odpowiedniego leczenia umożliwia poprawę stanu pacjenta, ustąpienie dolegliwości, poprawę wyników badań laboratoryjnych i zapobieganie odległym następstwom (np. marskości wątroby).

Z powyższych względów uważam, że podjęcie przez lek. Magdalenę Naorniakowską badań mających na celu analizę obrazu klinicznego, histopatologicznego, podłoża genetycznego oraz diagnostyki różnicowej choroby Wilsona w polskiej populacji pediatrycznej, jest jak najbardziej uzasadnione i stanowi dojrzałą analizę tego zagadnienia.

Przedstawiona mi do oceny praca cechuje się układem typowym dla rozpraw doktorskich. Obejmuje 94 strony maszynopisu, zawiera 5 rycin, 5 wykresów, 22 tabele oraz 84 pozycje piśmiennictwa. Rozprawa posiada również obszernie strukturalnie streszczenie w języku polskim i angielskim, spis tabel, wykresów, rycin oraz informacje na temat publikacji części wyników badań w czasopiśmie naukowym oraz prezentacji na konferencjach.

Wartościowym elementem jest objaśnienie zastosowanych w pracy skrótów, co ułatwia czytającemu

na bieżąco identyfikowanie stosowanej w rozprawie terminologii. Może warto byłoby ujednoczyć ich zapis- część jest w języku polskim, część z języku angielskim.

We **Wstępie** liczącym 11 stron Doktorantka w sposób przekonujący uzasadnia wybór tematu swojej rozprawy. Należy podkreślić, że Doktorantka reprezentuje ośrodek (Klinika Gastroenterologii, Hepatologii, Zaburzeń Odżywiania i Pediatrii Instytut „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka”) zajmujący się kompleksową opieką nad pacjentami pediatrycznymi z chorobą Wilsona z całej Polski. W związku z tym uzyskane w niniejszej pracy wyniki i poczynione obserwacje można ekstrapolować na całą polską populację pediatryczną z rozpoznaną chorobą Wilsona. We **Wstępie** Doktorantka szczegółowo, w oparciu o aktualne światowe piśmiennictwo omawia epidemiologię, podłoże genetyczne, etiopatogenezę, manifestację kliniczną z uwzględnieniem wieku chorych, diagnostykę (kryteria rozpoznania choroby Wilsona) - ze szczególnym zwróceniem uwagi na zmiany w badaniu histopatologicznym wątroby oraz możliwe opcje terapeutyczne. Chciałabym podkreślić, iż rozdział **Wstęp** może stanowić samodzielną, wyczerpującą monografię na temat choroby Wilsona, szczególnie w aspekcie populacji pediatrycznej. Tekst tego rozdziału jest napisany przejrzyście i świadczy o dużej praktycznej wiedzy medycznej i dobrym przygotowaniu teoretycznym Doktorantki.

W tym miejscu zwracam uwagę na drobne błędy w nazewnictwie: w wielu miejscach (nie tylko we **Wstępie**) Doktorantka używa terminu „poziom miedzi w moczu” prawidłowo „wydalanie miedzi w dobowej zbiórce moczu”.

W związku z tym, że jednym z elementów rozprawy jest analiza kilku przypadków klinicznych, w których wystąpiły problemy w diagnostyce różnicowej zapalenia wątroby (autoimmunizacyjne zapalenie wątroby czy choroba Wilsona), Doktorantka omówiła syntetycznie zagadnienia związane z autoimmunizacyjnym zapaleniem wątroby.

Przedstawione we **Wstępie** dane konsekwentnie i logicznie prowadzą do sformułowania hipotez badawczych oraz celów pracy, mających za zadanie zweryfikowanie zaproponowanych hipotez badawczych.

Zaproponowane hipotezy badawcze:

- Obraz kliniczny choroby Wilsona w polskiej populacji dzieci jest zróżnicowany, jednak ze zdecydowaną przewagą postaci wątrobowej o łagodnym przebiegu i bardzo rzadkim występowaniem objawów neurologicznych.
- Obraz histopatologiczny bioptatów wątroby dzieci z WD nie wykazuje specyficznych zmian, charakteryzuje się dużą różnorodnością. Włóknienie wątroby jest związane z parametrami uszkodzenia wątroby i wyliczanymi parametrami włóknienia (FIB-4 i APRI).

- W polskiej populacji dzieci z WD dominuje mutacja H1069Q, a pozostałe mutacje występują sporadycznie. Istnieje związek pomiędzy rodzajem mutacji a obrazem klinicznym choroby, nasileniem zmian histopatologicznych wątroby i parametrami gospodarki miedzią.
- Istnieje ryzyko pomyłek diagnostycznych, które skutkują nierozpoznanie choroby Wilsona, szczególnie w przypadku postaci wątrobowej przebiegającej z izolowanym wzrostem aktywności transaminaz.

Cele pracy:

- Opis zróżnicowanego obrazu klinicznego choroby Wilsona w polskiej populacji dzieci;
- Ocena zmian histopatologicznych oraz ich związku z obrazem klinicznym i parametrami laboratoryjnymi uszkodzenia wątroby, jak również z nieinwazyjnymi markerami włóknienia wątroby;
- Ocena częstości poszczególnych mutacji genu *ATP7B* oraz rodzaju mutacji i ich korelacja z obrazem klinicznym oraz zmianami w obrazie histopatologicznym;
- Ocena trudności diagnostyki różnicowej WD i AIH na przykładzie serii przypadków, u których zmieniono wstępne rozpoznania AIH.

W rozprawie została umieszczona informacja o pozytywnej opinii Komisji Bioetycznej przy IPCZD wyrażającej zgodę na przeprowadzenie badań.

W rozdziale **Metodologia** Doktorantka szczegółowo przedstawia sposób gromadzenia danych, zakres przeprowadzonej analizy (badanie podmiotowe, przedmiotowe, badania dodatkowe: parametry laboratoryjne, molekularne, histopatologiczne bioptatu wątroby z oceną zawartości miedzi w bioptacie wątroby).

Badanie opierało się na retrospektywnej analizie dokumentacji medycznej pacjentów z rozpoznaną chorobą Wilsona hospitalizowanych w Klinice Gastroenterologii, Hepatologii, Zaburzeń Odżywiania i Pediatrii Instytut „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka” lub będących pod opieką Poradni Chorób i Transplantacji Wątroby IPCZD w latach 1996-2021 – a więc obejmuje bardzo szeroki zakres czasowy – 25 lat. W ocenie pracy należy brać pod uwagę zmieniającą się dynamicznie (w okresie obserwacji) dostępność do wysokospecjalistycznych badań (np. badań molekularnych). W rozdziale Metodologia brak jest informacji w jakim laboratorium były wykonane badania molekularne. Doktorantka szczegółowo przedstawiła panel analizowanych parametrów, metodologię ich oznaczania. Wśród gromadzonych danych z badania podmiotowego zwrócono uwagę na „wywiad rodzinny w kierunku choroby Wilsona”. W mojej ocenie wywiad

należy uzupełnić o informacje dotyczące współwystępowania przewlekłych chorób wątroby w rodzinie, bowiem w wielu przypadkach przewlekłych schorzeń wątroby nie jest/nie była prowadzona pełna diagnostyka w kierunku choroby Wilsona. A w związku z tym, że analiza retrospektywna obejmuje przedział czasowy aż 25 lat, niektóre badania specjalistyczne (np. genetyczne) dzięki, którym aktualnie potwierdzamy diagnozę WD nie były wówczas dostępne. Wśród parametrów laboratoryjnych brakuje mi uwzględnienia badań oceniających cholestazę: aktywność GGTP oraz stężenie kwasów żółciowych w surowicy krwi.

Ogromną wartością pracy jest fakt niezależnej oceny przez 2 histopatologów preparatów histopatologicznych biopatów wątroby.

W mojej opinii wśród analizowanych wyników badań brakuje także oceny obrazowej wątroby np. powszechnie dostępnego badania ultrasonograficznego (badanie elastograficzne wątroby nie było dostępne w analizowanym przedziale czasowym).

Wyniki swoich badań i analiz Doktorantka przedstawiła w sposób opisowy oraz w formie rycin, wykresów oraz tabel. Do analizy retrospektywnej włączono 187 pacjentów z chorobą Wilsona będących pod opieką Kliniki Gastroenterologii, Hepatologii, Zaburzeń Odżywiania i Pediatrii IPCZD w latach 1996-2021. W badanej grupie pacjentów pierwsze objawy wystąpiły średnio w wieku $10,11 \pm 4,2$ lat (2-17,5), natomiast średni wiek ustalenia diagnozy wynosił $11,45 \pm 4,15$ lat (2-20,5). Jedynie u kilkunastu -13 (6,95%) badanych rozpoznanie ustalono przed ukończeniem 5 roku życia. W zdecydowanej większości (ponad 97%) badanych występowała postać wątrobowa (w tym izolowana hiperaminotransferazemia u 52,9% badanych), u pojedynczych chorych obserwowano zarówno objawy hepatologiczne jak i neurologiczne. Natomiast ze względu na diagnostykę rodzeństwa pacjentów z WD u 5 dzieci rozpoznanie ustalono przed wystąpieniem jakichkolwiek objawów chorobowych. Najczęstszą manifestacją wątrobową choroby była podwyższona aktywność aminotransferaz (>80%), niewydolność wątroby była stwierdzano u 15,5% chorych. Z tej grupy u 15 dzieci wykonano przeszczepienie tego narządu, troje dzieci wymagało retransplantacji, troje pacjentów zmarło. W tabeli nr 5 przedstawiającej pacjentów, u których wykonano przeszczepienie wątroby brak jest informacji na temat wieku chorych w chwili transplantacji. Jest to tym bardziej interesujące, że w przypadku chorób metabolicznych wraz z dłuższym okresem trwania choroby, objawy są bardziej nasilone. Interesująca jest historia medyczna pacjenta Nr 137, z niską punktacją w skali King 's Wilson index (4pkt), u którego wykonano 3-krotną transplantację wątroby i pacjent niestety zmarł. Proszę o krótkie mówienie przypadku w/w pacjenta.

Czy brak wyników badań genetycznych u 2-pacjentów, którzy poddani byli transplantacji wątroby wynika z faktu, że badanie ma charakter retrospektywny i oznaczeń nie wykonywano?

W tekście brak cytowania niektórych tabel, rycin, wykresów.

Z przedstawionych danych wynika, że wśród zaburzeń neurologiczno-psychiatrycznych w badanej grupie dzieci najczęściej (3,2%) stwierdzano incydenty napadowe (drżenia/padaczka) – proszę o interpretację w/w objawów, czy pacjenci ci wymagali stosowania leczenia p/padaczkowego.

Charakterystyczny pierścień KF stwierdzono w badaniu okulistycznym u 8 pacjentów - 3 z nich demonstrowało objawy neurologiczne. Proszę o podanie w jakim wieku byli pacjenci.

W dalszej części rozdziału **Wyniki** Doktorantka w tabelach i na wykresach przedstawia wyniki parametrów laboratoryjnych, oceny histopatologicznej bioptatów wątroby, zawartości miedzi w tkance wątrobowej –może warto byłoby to bardziej szczegółowo omówić w tekście rozprawy, ponieważ są one bardzo interesujące. Poziom ceruloplazminy w surowicy krwi był obniżony u 90% pacjentów (wartość poniżej 0,2 g/l), w części laboratoriów zakres normy wynosi $>0,16$. Czy wartości nie powinny być ujednoczone ? Wydalanie miedzi w dobowej zbiorce moczu było zwiększone ($>100\mu\text{g}/24\text{h}$) jedynie 54,6%. Czy u wszystkich pacjentów ze zwiększonym wydalaniem miedzi stwierdzono obniżone stężenie ceruloplazminy? Jeżeli poziom ceruloplazminy i wydalanie miedzi z moczem zależy od wieku pacjenta i zarazem najtrudniejszą diagnostycznie grupą chorych są najmłodsze dzieci czy nie powinno się rutynowo w tej grupie pacjentów zlecać oznaczanie poziomu ceruloplazminy, wydalania Cu w DZM oraz oznaczania Cu w bioptacie wątroby?

Bardzo ciekawą jest korelacja pomiędzy poziomem ceruloplazminy, wydalaniem miedzi w DZM i stężeniem miedzi w bioptacie wątroby a nasileniem stłuszczenia wielkokropelkowego. Z kolei tylko wydalanie miedzi w DZM korelowało ze stopniem nasilenia zapalenia wrotnego, włóknienia oraz cholestazy. Nie stwierdzono zależności pomiędzy poziomem ceruloplazminy oraz zawartością Cu w bioptacie wątroby a tymi parametrami. Jak można by to wytłumaczyć?

Brakuje mi norm FIB4 oraz APRI oraz u ilu pacjentów wartości tych parametrów były nieprawidłowe. Trudno stwierdzić, że istnieje zależność pomiędzy wynikami FIB4 oraz APRI a aktywnością AspAT, gdyż parametr ten jest niezbędny do ich obliczenia. Czy czułość FIB4 (58,33%) i APRI (60.42%) w wykrywaniu włóknienia można uznać za zadawalającą- przy ich podwyższeniu wykrywane są raczej zmiany bardzo zaawansowane.

Badanie genetyczne zostało wykonane u 180 pacjentów. Najczęstszą mutacją okazała się H1069Q, która została stwierdzona z częstością alleli 67,56% (71 przypadków układ homozygotyczny, u 69 heterozygotyczny). Co ciekawe wykazano zależność pomiędzy rodzajem mutacji a stężeniem ceruloplazminy (w ciężkich mutacjach średnie stężenie ceruloplazminy wynosiło średnio-0.04g/l). Natomiast nie wykazano korelacji pomiędzy rodzajem mutacji a zmianami w badaniu histopatologicznym bioptatu wątroby.

Należy podkreślić, że u każdego pacjenta z rozpoznaną chorobą Wilsona należy wykluczyć autoimmunizacyjne zapalenie wątroby, a u każdego pacjenta z autoimmunizacyjnym zapaleniem wątroby trzeba wykluczyć chorobę Wilsona. Dodatkowo przedstawione 3 opisy przypadków podkreślają wartość rozprawy doktorskiej oraz zwracają uwagę na trudności diagnostyczno-terapeutyczne w tej grupie chorych.

W dalszej części rozprawy (**Dyskusja**) Autorka szczegółowo analizuje wyniki własnych badań, porównuje je z danymi uzyskanymi przez innych badaczy. Podkreślam, że niniejsza praca prezentuje jedną z największych opublikowanych kohort pediatrycznych pacjentów z chorobą Wilsona z jednego ośrodka dostępnych w literaturze światowej, jak również związek pomiędzy parametrami obrazu histopatologicznego, wynikami badania molekularnego z obrazem klinicznym, badaniami laboratoryjnymi oceniającymi funkcję oraz uszkodzeniem wątroby. Wartość pracy podkreśla, że wycinki wątroby zostały poddane ocenie przez dwóch niezależnych histopatologów, dzięki czemu wyniki zostały dobrze wystandaryzowane.

Piśmiennictwo przedstawione w rozprawie zawiera 84 pozycje, w większości anglojęzyczne, zostało ono właściwie dobrane, dominują prace z ostatnich lat. W kilku pozycjach brakuje zapisu zakresu stron.

Staranna analiza wyników przeprowadzonych badań poddanych analizie statystycznej oraz danych dostępnych z piśmiennictwa pozwoliła na sformułowanie **wniosków**, pozwalających na zweryfikowanie hipotezy badawczej oraz będących odpowiedzią na postawione cele badawcze. Część wniosków jest wynikami badań.

Wnioski:

1. Obraz kliniczny choroby Wilsona w polskiej populacji dzieci jest zróżnicowany, a dominująca u dzieci jest manifestacja wątrobowa.
2. Obraz histopatologiczny biopsji wątroby w chorobie Wilsona wykazuje dużą różnorodność. Nie ma zmian patognomicznych, jednak stosunkowo często występuje stłuszczenie.
3. Nieinwazyjne wskaźniki włóknienia takie jak APRI i FIB-4 mogą być użyteczne w monitorowaniu włóknienia u dzieci z chorobą Wilsona.
4. Najczęstszym patogennym wariantem molekularnym genu ATP7B polskiej populacji dzieci z chorobą Wilsona jest H1069Q.
5. Brak związku pomiędzy obrazem histopatologicznym oraz wynikiem badania genetycznego potwierdza niewielki wpływ genotypu na fenotyp.
6. Postawienie diagnozy jest stosunkowo proste, jeśli obecne są główne cechy kliniczne i laboratoryjne, jednak w szczególnych przypadkach ustalenie diagnozy może być dużym wyzwaniem dla klinicystów, szczególnie u młodszych pacjentów i na wczesnych etapach choroby.

7. U wielu pacjentów poszczególne parametry były prawidłowe (Nie opisano pierścienia KF, wydalanie miedzi z moczem czy poziom ceruloplazminy były w granicach normy), co podkreśla znaczenie wykorzystania pełnej skali Ferenciego oraz wartość testów genetycznych w rozpoznaniu choroby Wilsona w populacji pediatrycznej.

Poza drobnymi błędami edytorskim praca jest napisana starannie i przejrzysto, a prezentowane tabele, ryciny i schematy są czytelne. Poprawki są wymagane w układzie graficznym (np. przesunięcia na stronie 7, 31 oraz 37). Autorka nie ustrzegła się błędów literowych i stylistycznych (strona 78,84)

Wydaje się, że powyższa praca może być pomocna w codziennej pracy klinicznej, ale też może być źródłem inspiracji do przyszłych badań naukowych. Na pewno interesujące byłoby kontynuowanie badań obejmujących populację osób dorosłych, z uwzględnieniem korelacji genotyp-fenotyp w tej grupie pacjentów.

Cenna jest zawarta w tej części pracy informacja o ograniczeniach badania jakim jest retrospektywny charakter pracy, w związku z tym brak niektórych parametrów np. brak oceny parametrów cholestazy (aktywność GGTP, stężenie kwasów żółciowych). Jednak pomimo pewnych obiektywnych ograniczeń otrzymane wyniki dostarczają niezwykle wartościowych, praktycznych informacji/wskazówek na temat postępowania diagnostyczno-terapeutycznego w tej grupie chorych.

Dodatkowo należy podkreślić, że wyniki powyższej pracy były częściowo przedstawione na zjazdach i konferencjach krajowych i międzynarodowych. Warto jest przedstawić autorów doniesień. Część wyników była opublikowana- warto przedstawić punktację IF oraz MNiSW publikacji.

Poczynione uwagi, nie wpływają na kompleksową, jednoznacznie pozytywną ocenę pracy zarówno pod względem merytorycznym, jak i edytorskim.

Należy podkreślić, że problematyka przeprowadzonych przez Autorkę badań dostarczyła ważnych i cennych z punktu widzenia praktycznego danych na temat choroby Wilsona w populacji pediatrycznej.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska lek. Magdaleny Naorniakowskiej pt.: **Choroba Wilsona w polskiej populacji dzieci - obraz kliniczny, histopatologiczny, diagnostyka różnicowa i podłoże genetyczne**”, spełnia wymagania stawiane rozprawom na stopień naukowy doktora nauk medycznych określonym w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (6 Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018

r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzenia czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz postępowaniu o nadanie tytułu profesora.

W związku z tym wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka w Warszawie o dopuszczenie lek. Magdaleny Naorniakowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego i ze względu na dużą wartość przeprowadzonych badań nie tylko naukową, również praktyczną, wnioskuję o wyróżnienie pracy.

Sabina Więcek

dr hab.n.med. Sabina Więcek