Lublin, dn. 17 czerwca 2022 roku

Marzena Laskowska, dr hab. n. med.
Katedra i Klinika Położnictwa i Perinatologii
Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Dodatkowa recenzja poprawionej rozprawy doktorskiej
lek. med. Małgorzaty Zembali-Szczerby
pt.: "*Rola wolnych krążących płodowych kwasów nukleinowych w etiopatogenezie nadciśnienia tętniczego w ciąży oraz stanu przedrzucawkowego i ich potencjał diagnostyczny*" wykonanej w Oddziale Klinicznym Położnictwa i Perinatologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie pod kierunkiem Pana Prof. dr hab. n. med. Huberta Hurasa.

Uwagi ogólne i układ konstrukcji rozprawy

Przedłożona mi do recenzji **poprawiona** rozprawa doktorska lekarz medycyny Małgorzaty Zembali-Szczerby obecnie liczy łącznie 105 stron, z tego 91 stron obejmuje tekst samej rozprawy ze streszczeniem w języku polskim i angielskim oraz spis zawartych w dysertacji 2 rycin i 36 tabel. Kolejne 13 stron zawiera bibliografię składającą się obecnie ze 177 pozycji literatury w języku polskim i angielskim. Doktorantka na początku dysertacji zawarła pomocny dla czytelnika wykaz stosowanych skrótów.

Rozdział VI Materiał i metody oraz Rozdział VII Wyniki to jedyne rozdziały, które zostały poprawione, a właściwie zmienione. W Rozdziałach tych Doktorantka wyjaśniła poprzednie zastrzeżenia, co do pobierania krwi oraz opisywanych poprzednio wykonywanych badań pozostających bez dalszego odniesienia do ich wyników w dalszej części pierwszej wersji dysertacji. Doktorantka w drugiej wersji dysertacji dodała wyniki badań ultrasonograficznych, dane odnośnie wieku ciąży w czasie pobierania krwi do badań oraz sposobu i czasu porodu w poszczególnych grupach: badanej wraz z podgrupami oraz w grupie kontrolnej, wraz ze wskazaniami do cięcia cesarskiego.

Wszystkie uprzednio (w pierwszej wersji dysertacji) zamieszczone w rozdziale Wyniki zarówno ryciny, jak i tabele zostały usunięte. Obecnie dysertacja zawiera 2 ryciny oraz 36 tabel. Wszystkie są nowe i zostały podane dokładnie z podaniem jednostek. Autorka podała także opisy tabel. Inne są także wyniki uzyskane z badań wolnego DNA – cfDNA i cffDNA oraz aktywności DNAzy.

Pozostały niezmienione hipotezy badawcze.

Wnioski zostały dyskretnie skorygowane, w dużej części właściwie niezmienione; są nieco ogólne i nie stanowią odpowiedzi na cel główny jakim było „*ustalenie roli wolnego DNA w etiopatogenezie nadciśnienia tętniczego i stanu przedrzucawkowego u kobiet ciężarnych, a także określenie czy podwyższony poziom wolnego DNA płodowego w ciążach powikłanych jest wynikiem pojawienia się tej patologii czy leży u jej podstaw*".

Ponadto wnioski nie stanowią także odpowiedzi na wszystkie cele szczegółowe, są nieprecyzyjne, nie oddają istoty wyników, a niekiedy im zaprzeczają. Np. wniosek nr 2 „*stwierdzono wyższe wartości poziomu cfDNA i jego frakcji płodowej w grupie pacjentek , u których stwierdzono wystąpienie stanu przedrzucawkowego w porównaniu do grupy pacjentek z izolowanym nadciśnieniem tętniczym, a zależność ta była bardziej widoczna w grupie pacjentek z nadciśnieniem ciążowym niż przewlekłym*"

A w wynikach tabela 22 strona 65 jest to zgodne dla cffDNA, ale został podany inny wynik dla cfDNA:" *dla NT przewlekłe – 3,22 dla NT przewlekłe +PE – 12,89 (czyli 4.krotny wzrost), a dla NT ciążowe – 7,62 a dla NT ciążowe +PE – 15,04 (ok. 2. krotny wzrost).*

Autorka nie daje odpowiedzi na postawiony cel szczegółowy nr 4 „*czy podwyższony poziom cffDNA jest skutkiem czy przyczyną wystąpienia nadciśnienia tętniczego w ciąży*".

Dla czytelnika jest także niejasne jak został opisany w dysertacji „*model mediowanej przez wolne płodowe DNA odpowiedzi immunologicznej prowadzącej do wystąpienia nadciśnienia w ciąży*" – cel szczegółowy nr 5 postawiony przez Doktorantkę (strona 31 dysertacji).

Skrócony został wniosek nr 1, a w części wniosków zniknęło odniesienie do frakcji płodowej.

Ponadto wnioski od nr 4 do nr 6 opisujące korelację uzyskanych wyników znajdują poparcie w wynikach korelacji przeprowadzonych jedynie w grupie badanej. Nie wykonano analizy w/w korelacji wyników tych badań uzyskanych w grupie kontrolnej.

Budzi to pewne wątpliwości co do rzeczywistych wyników i wpływu na te wyniki opisywanych schorzeń. Byłoby uzasadnione prześledzenie czy te korelacje są także obecne / istotne w grupie kontrolnej, czy też można je łączyć jedynie z występowaniem powikłań ciąży takich, jak nadciśnienie tętnicze czy stan przedrzucawkowy.

Ocena korelacji w grupie kontrolnej pozwoliłaby także na odpowiedź na pytanie czy rzeczywiście cukrzyca ciążowa oraz subkliniczna niedoczynność tarczycy pozostają bez wpływu na poziom badanych kwasów nukleinowych. Brak także danych nt. korelacji cfDNA z aktywnością DNAzy w grupie kontrolnej.

Wniosek nr 5 podaje, iż „*w grupie badanej stwierdzono dodatnią korelację wieku matki z poziomem cfDNA*".

Jednakże trudno zinterpretować te dane bez odniesienia do grupy kontrolnej skoro nie wykonano tych badań statystycznych w grupie kontrolnej. Nie jest jasne dla czytelnika dlaczego korelacje zostały wykonane tylko w grupie pacjentek z ciąża powikłaną.

Istotne znaczenie ma także informacja, jak Autorka interpretuje te dane – czy to jest wynik charakterystyczny jednie dla ciężarnych z ciążą powikłaną nadciśnieniem tętniczym i/ lub stanem przedrzucawkowym, czy też są to normalne trendy niezakłócone przez występowanie opisywanych powikłań ciąży.

Wydaje się, że może to mieć znaczenie dla interpretacji wyników badań.

Autorka zaobserwowała także w grupie badanej „*dodatnią zależność*" poziomu AST i ALT od poziomu cfDNA oraz AST i cffDNA oraz „*ujemną korelację*" poziomu białka całkowitego zarówno z cfDNA, jak i cffDNA.

Tutaj również nie przeprowadzono analizy w/w korelacji w grupie kontrolnej i nie ma tych danych dla grupy kontrolnej. Jednocześnie należy zaznaczyć, że wszystkie podane wartości transaminaz u wszystkich pacjentek we wszystkich badanych grupach oraz w grupie kontrolnej pozostawały w granicach normy, zaś niewielkie przesunięcia białka całkowitego wydaje się, iż nie odbiegały w sposób istotny od wartości obserwowanych u kobiet ciężarnych.

Czy Doktorantka mogłaby wyjaśnić celowość badania takich korelacji i ich interpretację? Trudno bowiem znaleźć mi wyjaśnienie i uzasadnienie dla analiz tych korelacji poziomów cfDNA i cffDNA z AST, ALT i poziomem białka całkowitego.

Wątpliwości budzi także stwierdzenie Doktorantki, iż „*Przy uwzględnieniu liczby zastosowanych leków w grupie badanej, zaobserwowano wyższy względny poziom cfDNA. Ponadto wraz z intensyfikacją leczenia istotnie zmieniał się poziom aktywności DNAzy – niższe średnie wartości zanotowano u pacjentek, których stan wymagał włączenia co najmniej 3 leków*„.

Wydaje się, iż to nie ilość leków wpływa na poziom cfDNA i DNAzy a raczej może ciężkość schorzenia koreluje z wynikami badań cfDNA i DNAzy, co z kolei znajduje odzwierciedlenie w konieczności intensyfikacji leczenia i wdrożenia politerapii.

Wydaje się także za uzasadnione prześledzenie korelacji wieku ciążowego z poziomami cfDNA, cffDNA i aktywnością DNAzy oraz odpowiedzi na pytanie czy różnice wyników miały odniesienie co do przedwczesnego ukończenia ciąży, może i do ciężkości schorzenia i czy mogłyby stanowić wskazówkę prognostyczną mogącą mieć zastosowanie kliniczne w przyszłości.

Natomiast zarówno rozdział wstęp, jak i rozdział dyskusja poddane zostały jedynie drobnej, kosmetycznej i nieistotnej korekcie, co nie wpłynęło na jakość tych rozdziałów. Są to części pracy bardzo chaotyczne, z dużą ilością błędów literowych, stylistycznych i niestety merytorycznych. Te rozdziały są dosyć chaotyczne i trudne dla czytelnika.

Ponadto nadal pozostaje nieścisłość / błąd podnoszone w poprzedniej mojej recenzji co do określenia zawartego w akapitach o oznaczeniach frakcji DNA (matczynej i płodowej) i ich odmiennego profilu metylacji. Przytoczę jeszcze raz cytaty podnoszone w mojej poprzedniej recenzji : Na stronie 39 Doktorantka napisała cyt.: „*Ten odcinek genomu jest hipermetylowany w łożysku, natomiast w komórkach matczynych występuje hipometylacja*". Natomiast na stronie 27 mamy informację cyt.: „cfDNA płodu jest hipometylowane".

Jak pisałam powyżej rozdziały Wstęp i Dyskusja właściwie pozostały niezmienione, a poddane jedynie kosmetycznym poprawkom.

Wydaje się, iż Dyskusja stanowi właściwie przegląd literatury i nie zawiera do końca odniesień do badań własnych Autorki. Kilka zdań takich odniesień znalazło się w sekcji Wyniki.

Ponadto odniesienia do cytowanych artykułów i autorów publikacji naukowych w wielu miejscach np. Dyskusji są błędne.

Podam przykład:

Na stronie 78 autorka napisała „Kim i in wykazali że istnieje pozytywna korelacja pomiędzy stężeniem hipermetylowanego RASSF1A.."- odnośniki do literatury w pobliżu tego stwierdzenia to 93 - praca autorstwa Jakobsen i wsp. ; 170 - to praca Galbiati i wsp. i 171 – praca Gutensohn i wsp.

W spisie literatury mamy podaną jedną publikację Kim i wsp. pod numerem 159 – jest to *Chong Jai Kim, Roberto Romero, Piya Chaemsaithong, Jung-Sun KimChronic inflammation of the placenta: definition, classification, pathogenesis, and clinical significance. Am J Obstet Gynecol 2015;213(4Suppl):S53-69*

Jednak publikacja ta niestety nie zawiera tych danych, na które powołuje się Doktorantka.

Pewne moje wątpliwości budzi też poszerzenie bazy literaturowej ze 114 do 177 pozycji właściwie bez dużych istotnych zmian treści zarówno rozdziału Wstęp, jak i Dyskusja.

W tych rozdziałach zostały wprowadzone jedynie drobne, dyskretne i nieistotne zmiany. Trudno określić jaki był klucz dopisywania przez Autorkę do wcześniejszego tekstu dysertacji nowych cytowanych publikacji.

Nieco niezręczne są także stwierdzenia Autorki odnoszące się do analizy statystycznej, np. : „*wykazano ujemną umiarkowaną korelację*", „w analizie stwierdzono przeciwstawny związek poziomu cfDNA i ryzyka wystąpienia cukrzycy".

Ogromnie doceniam wkład pracy Doktorantki w zmianę rozdziałów: Wyniki oraz Metody, ale niestety całość dysertacji nadal budzi zastrzeżenia natury merytorycznej.

Biorąc pod uwagę powyższe nieprawidłowości i błędy niestety z ogromną przykrością stwierdzam, iż *nie mogę* wydać pozytywnej oceny przedstawionej mi do recenzji drugiej wersji dysertacji lek. med. Małgorzaty Zembali-Szczerby pt.: „*Rola wolnych krążących płodowych kwasów nukleinowych w etiopatogenezie nadciśnienia tętniczego w ciąży oraz stanu przedrzucawkowego i ich potencjał diagnostyczny*".

Marzena Laskowska

Lublin, dnia 17 czerwca 2022 roku

Dr hab. n. med.
Marzena Laskowska
specjalista ginekologii i położnictwa
perinatolog
3066669