



Dr hab. n. med. Prof. UJK Wojciech Rokita  
Kierownik Kliniki  
Położnictwa i Ginekologii

Wojewódzki Szpital Zespolony  
Ul. Grunwaldzka 45, 25-726 Kielce  
Tel. kom. 601 480 918  
Tel. 41 36 71 263 fax 41 345 10 09  
email: rokita@kielce.com.pl

Kielce 18.06.2017 r.

## Recenzja rozprawy doktorskiej lek. Piotra Barana

pt : „*Ocena stężeń cytokin u kobiet ciężarnych z przedwczesnym pęknięciem błon płodowych*”

Przedwczesne pęknięcie błon płodowych to samoistne przerwanie ich ciągłości w dowolnym momencie trwania ciąży. Jest ono określane akronimem PROM (ang. Preterm Rupture of Membranes) szczególnie istotne ze względu na swoje konsekwencje jest rozerwanie pęcherza owodniowego przed ukończonym 37 tygodniem ciąży, które definiowane jest jako przedwczesne pęknięcie błon płodowych przed terminem – pPROM (ang. Preterm Premature Rupture of Membranes). pPROM dotyczy 3-5% wszystkich ciąży, jest główną przyczyną porodów przedwczesnych i odpowiada za około 30% tych porodów. pPROM stanowi ogromny problem w skali globalnej i jest jedną z głównych przyczyn zgonów noworodków w okresie okołoporodowym. Brak jest dokładnych danych dotyczących skali tego zjawiska w Polsce. Etiologia przedwczesnego pęknięcia błon płodowych jest złożona i wieloczynnikowa. Mechanizmy które doprowadzają do pPROM nie są do końca poznane. Obecnie uważa się, że najistotniejsze są procesy dziejące się na poziomie komórkowym. W bezpośrednim sąsiedztwie miejsca pęknięcia błon płodowych dochodzi do zjawiska apoptozy i zniszczeniu ulegają włókna sieci kolagenowych. Mediatorami tych reakcji obok prostaglandyn i niektórych hormonów regulujących ekspresję i aktywizację enzymów uszkadzających macierz zewnątrzkomórkową błon płodowych są również cytokiny oraz chemokiny, które

*Am*



produkowane są przez doczesną, kosmówkę i owodnię. Substancje te są zdolne do rekrutacji różnych subpopulacji leukocytów, które uwalniają szereg aktywnych związków tworzących wzmacniającą się kaskadę reakcji chemicznych doprowadzających do pęknięcia błon płodowych. Biorąc to pod uwagę oraz wiedząc, że dotychczasowe metody diagnostyki i postępowania w pPROM nie przynoszą oczekiwanych rezultatów nie ma wątpliwości, że istnieje pilna konieczność poszukiwania nowych biomarkerów pPROM. Dzięki temu istnieje nadzieja na zmianę tych niekorzystnych trendów epidemiologicznych. W polskim piśmiennictwie obecne są jedynie nieliczne prace oceniające wybrane polimorfizmów genów kodujących cytokiny w patogenezie porodu przedwczesnego. Nie znalazłam natomiast w naszej literaturze doniesień, które w sposób kompleksowy oceniałyby poziomy stężenia cytokin w surowicy krwi kobiet w ciąży powikłanej pPROM. Dlatego z ogromnym zainteresowaniem zasiadłam do lektury rozprawy doktorskiej lek. Piotra Barana nt:” „Ocena stężeń cytokin u kobiet ciężarnych z przedwczesnym pęknięciem błon płodowych”.

Przedstawiona mi do oceny dysertacja doktorska ma typowy układ dla tego typu prac, liczy 53 strony tekstu, które uzupełnione zostały 80 pozycjami piśmiennictwa, 15 tabelami i 2 rycinami. Tekst rozprawy został napisany w sposób bardzo syntetyczny, starannie, zrozumiałym językiem a jej przejrzysty układ czyni pracę bardzo czytelną. Dysertacja składa się z 9 głównych rozdziałów. We wstępie na 11 stronach tekstu autor przedstawił epidemiologię przedwczesnego pęknięcie błon płodowych oraz znaczenie tej patologii w etiologii porodu przedwczesnego. Zwrócił również uwagę na bardzo ważny fakt, że pomimo postępu wiedzy medycznej wciąż brak jest sposobów pozwalających na skuteczną predykcję pPROM oraz że istnieje pilna konieczność wdrożenia nowych metod diagnostycznych które pozwoliłyby na wczesne rozpoznanie tego powikłania. W dalszej części wstępu lek. Piotr Baran przybliżył podstawy anatomiczne budowy worka owodniowego oraz definicję PROM i porodu przedwczesnego według aktualnie obowiązujących kryteriów. Trudno jest się zgodzić z przedstawioną przez doktoranta definicją noworodka niedonoszonego (wcześniaka) w której posłużył się jedynie wartościami masy ciała w przedziale 500-2500g. W tym miejscu rodzi się pytanie czy każdy wcześniak musi ważyć poniżej 2500g ?, jak również czy noworodek powyżej 2500g nie może być wcześniakiem? Następnie autor omówił kryteria rozpoznania PPRM dokładnie opisując aktualnie dostępne metody diagnostyczne oraz czynniki ryzyka PROM



i pPROM. Zwrócił uwagę na znaczenie infekcji, czynników genetycznych, nałogów, roli ciąży wielopłodowych oraz zwiększonej objętości płynu owodniowego w etiologii pPROM. W grupie czynników ryzyka pPROM doktorant uwzględnił również krwawienie z dróg rodnych w ciąży, niedobory żywieniowe i niską masę ciała u kobiet przed zajściem w ciążę oraz choroby matki wikłające ciążę. Do grupy czynników ryzyka pPROM określonych jako wady wrodzone narządu rodnego obok wad rozwojowych macicy doktorant, zaliczył także niewydolność cieśniowo-szyjkową oraz mięśniaki macicy cytując w tym miejscu pracę z 2007 rok autorów irańskich. Jest to niezrozumiałe dla recenzenta, chociaż być może 10 lat temu w Iranie macica mięśniakowata i niewydolność cieśni i szyjki macicy kategoryzowane były jako wady rozwojowe żeńskich narządów moczowo-płciowych. Jednak według aktualnie obowiązujących na świecie kryteriów patologie te nie są zaliczane do grupy wad rozwojowych narządu rodnego u kobiet. W końcowej części wstępu lek. Piotr Baran bardzo przystępnie w przejrzysty sposób przedstawił patogenezę przedwczesnego pęknięcia błon płodowych oraz charakterystykę badanych w pracy cytokin IGFBP-1, IGFBP-2, BDNF L-selektyny, E-selektyny, ICAM-1, PECAM-1, VCAM-1, MIP-1d, MIP-3b, Eotaksyna -1, Eotaksyna-2 oraz BLC.

Cel pracy został sformułowany prawidłowo oraz jednoznacznie. Główny zadaniem doktoranta była próba oceny zastosowania pomiarów stężeń wybranych cytokin w predykcji PPRM u kobiet ciężarnych bez klinicznych objawów zakażenia. Cel ten autor zrealizował poprzez ocenę stężeń w surowicy krwi protein związanych z formowaniem nacieków zapalnych w obrębie doczesnej, błon płodowych, łożyska, a także sznura pępowinowego:

1. Białek krążących o zmiennej ekspresji podczas fazy zapalnej : IGFBP-1, IGFBP-2, BDNF, CRP
2. Białek powierzchniowych biorących udział w reakcji leukocyтарно-endothelialnej, L-selektyny, E-selektyny, PECAM-1, ICAM-1, VCAM-1
3. Chemokin MIP-1d, MIP-3b, BLC, Eotaksyny-1, Eotaksyny-2.

Badania przeprowadzono w grupie 47 kobiet ciężarnych hospitalizowanych z powodu przedwczesnego pęknięcia błon płodowych w Oddziale Położniczo-Ginekologicznym Wojewódzkiego Szpitala w Przemyślu w latach 2009-2013. Warunkiem włączenia do grupy badanej było spełnienie co najmniej 2-ch spośród 3 poniżej podanych kryteriów:



1. Uwidocznienie podczas badania ginekologicznego w sterylnym wzierniku obecności płynu owodniowego wypływającego z ujścia zewnętrznego szyjki macicy
2. dodatni wynik testu nitrazynowego (zmiana barwienia papierka nasączonego nitrazyną z żółtego na niebieski)
3. dodatni wynik testu immunochromatycznego (AmniSure)

Średni czas jaki minął od pęknięcia błon płodowych do włączenia do badania wynosił 3 godziny 46 minut (przedział od 30 min do 26 godzin). Grupę kontrolną stanowiło 99 kobiet w początkowym okresie porodu z rozwarciem szyjki macicy do 3 cm z zachowanym pęcherzem płodowym. W przedstawionej do recenzji pracy brak jest jednak danych dotyczących czasu i miejsca hospitalizacji pacjentek tworzących grupę kontrolną (referencyjną). Zdaniem recenzenta informacje te są na tyle istotne, że powinny być zamieszczone w treści pracy. U wszystkich pacjentek z pPROM wdrożono postępowanie diagnostyczno-terapeutyczne zgodne z aktualnie obowiązującymi standardami. Przyjęte przez lek. Piotra Barana kryteria wykluczenia pozwoliły na wyeliminowanie z badań pacjentek u których mogły być uwalniane mediatory zapalne co uniemożliwiło by obiektywną ocenę poziomu cytokin w początkowej fazie pPROM. Dzięki temu autorowi udało się stworzyć bardzo jednorodną grupę badanych kobiet w której poziomy stężenie cytokin w początkowym okresie pPROM nie podlegały wpływom modulatorów reakcji zapalnych, a oznaczone wartości można traktować jako rzeczywiste biomarkery przedwczesnego pęknięcia pęcherza płodowego. Taki dobór kobiet do grupy badanej świadczy o wysokim poziomie warsztatu naukowego autora oraz o dokładnym zgłębieniu wiedzy na temat opracowywanego zagadnienia. Materiał do badań w grupie badanej i referencyjnej stanowiło 15ml krwi pełnej którą dzielono na 2 próbki: 5 ml na surowicę do probówki z separatorem i 10ml na osocze do probówki z EDTA. Pobraną krew następnie odwirowano, miareczkowano i zabezpieczano do oznaczeń przechowując w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$ . Próbkę w celu oznaczeń biomarkerów transportowano na suchym lodzie do certyfikowanego laboratorium RayBiotech Norcross (USA). Oznaczenie poziomu białka CRP wykonano w laboratorium Wojewódzkiego Szpitala Zespolonego w Przemyślu. Podsumowując dobór pacjentek z pPROM w grupie badanej oraz kobiet z grupy kontrolnej jak i zastosowane metody badawcze nie budzą zastrzeżeń. Doktorant nie przekazał natomiast żadnych informacji na temat oceny swojego projektu



badawczego przez komisję bioetyczną. Recenzent ma nadzieję, że realizacja badań rozpoczęła się dopiero po zaopiniowaniu planu badań przez odpowiednią Komisję Bioetyczną. Analiza statystyczna uzyskanych wyników badań została przeprowadzona prawidłowo za pomocą odpowiednich testów z użyciem nowoczesnych narzędzi statystycznych. Zdaniem recenzenta, jednak przy jednoczesnej analizie tak wielu zmiennych celowe jest uzupełnienie opracowania statystycznego dodatkowo o analizę regresji logistycznej lub podjęcie próby zbudowania sieci neuronowej. Ponieważ jak uczy doświadczenie badawcze w wielu przypadkach mimo braku istotności statystycznej pojedynczych czynników okazuje się, że w modelu regresji logistycznej parametry uzyskują istotność statystyczną z powodu zjawiska interakcji. Uwagi te nie mają jednak wpływu na wartość merytoryczną pracy i recenzent ma nadzieję, że powyższe sugestie doktorant wykorzysta w przyszłości kontynuując swoje badania lub uwzględni je w kolejnych wydaniach rozprawy doktorskiej.

Wyniki badań lek. Piotr Baran przedstawił na 10 stronach tekstu zamieszczając je w 15 tabelach i obrazując 2 rycinami, które zostały włączone do tekstu pracy. Uogólnienie wyników badań zostało dokonane w oparciu o analizę statystyczną przy użyciu profesjonalnych narzędzi statystycznych. Należy stwierdzić że algorytm doboru testów został każdorazowo spełniony. Wyniki badań uzyskane przez lekarza Piotra Barana wykazały, że średni wiek kobiet z pPROM nie różnił się istotnie od wieku rodzących z grupy kontrolnej. Nie wykazano również istotnych statystycznie różnic pomiędzy obydwu grupami w liczbie przeżytych ciąż. Charakterystyka badanych grup kobiet wykazała jedynie różnice w wartościach pH pochwy oraz parametrach wynikających z różnego wieku ciążowego oraz szacowanych mas płodów. Oceniając korelację wartości stężeń białka CRP ze stężeniami innych markerów biochemicznych w surowicy krwi u kobiet z przedwczesnym odpływaniem płynu owodniowego autor nie stwierdził istotnych korelacji pomiędzy stężeniami CRP a stężeniami: BDNF, BLC, Eotaksyny-1, Eotaksyny-2, E-selektyny, ICAM-1, IGFBP-1, IGFBP-2, L-selektyny, MIP-1d, MIP-3b, PECAM-1, VCAM-1. Niezrozumiała jest natomiast dla recenzenta interpretacja wyników dotycząca oceny poziomów białka CRP w grupie z pPROM i w grupie referencyjnej. W tabeli nr 2 na stronie 26 zamieszczono wyniki poziomów CRP w badanych grupach z których jednoznacznie wynika, że wartość stężeń białka CRP w grupie badanej była istotnie statystycznie wyższa niż w grupie kontrolnej. Co prawda wyniki dalszej



analizy statystycznej nie pozwoliły na wyznaczenie istotnego poziomu odcięcia za pomocą krzywej ROC co nie oznacza, że wartości CRP w badanych grupach były istotnie statystycznie różne i należało to zdaniem recenzenta podkreślić prezentując wyniki badań. Doktorant dokonał bardzo wnikliwych porównań stężeń oznaczanych cytokin u pacjentek z pPROM i w grupie kontrolnej. Wyniki przeprowadzonego porównania wykazały, że stężenie w surowicy krwi Eotoksyny-2 poniżej 8,24 pg/ml było markerem występowania pPROM którego czułość i specyficzność wyniosły odpowiednio 58% i 57%. Zdaniem recenzenta jest to najważniejsza z obserwacji jakiej dokonał autor recenzowanej pracy. Bardzo interesujące jest również wykazanie przez doktoranta braku istotnych statystycznie różnic w stężeniach białka wiążącego insulinopodobny czynnik wzrostu typu 1 (IGFBP-1) w grupie pPROM. Jest to o tyle ciekawe że IGFBP-1 jest wykrywany w komercyjnym testem immunochromatycznym Actim PROM, którego czułość szacowana jest na 87,5%, a swoistość 94,4% o czym wspomina doktorant na stronie 17 rozprawy charakteryzując badane cytokiny. Być może różnice te wynikają z tego że lek. Piotr Baran oznaczał IGFBP-1 w surowicy krwi, a w teście Actim PROM białko to oznaczane jest w wydzielinie pochwowej. Na uwagę zasługuje bardzo wnikliwie przeanalizowanie korelacji pomiędzy licznymi zmiennymi, co świadczy o dużej dojrzałości naukowej doktoranta.

Recenzent jest zadowolony z przedstawionej dyskusji, która w pełni konfrontuje otrzymane wyniki badań z częściowo sprzecznymi danymi literaturowymi. Dyskusja jest nie tylko podsumowaniem otrzymanych rezultatów lecz pełną przypuszczeń naukowych próbą skonfrontowania własnych wyników z danymi z piśmiennictwa.

Rozprawę wieńczą 2 wnioski które w pełni wynikają z przeprowadzonych badań i założonych celów pracy. Szczególnie ważny jest wniosek 1 ponieważ ma znaczenie praktyczne i stwarza nadzieję na wykorzystanie nowego biomarkera w predykcji tak bardzo istotnego powikłania ciąży jakim jest pPROM.

Rozprawę oceniam bardzo wysoko i uważam, że lekarz Piotr Baran bardzo dobrze opanował metodykę pracy naukowej. Dysertacja doktorska stanowi samodzielne rozwiązania przez autora problemu naukowego oraz wykazuje niezwykle wysoką wiedzą teoretyczną i praktyczną w podjętym temacie. Dla mnie osobiście jako praktyka szczególne znaczenie ma fakt, że przeprowadzone badania są bezpośrednio powiązane z działalnością kliniczną i dotyczą wciąż aktualnego i niezwykle ważnego problemu w perinatologii jakim jest



przedwczesne pęknięcie błon płodowych. Doktorant doskonale poradził sobie z tym niełatwym zagadnieniem. Na uwagę zasługuje bardzo precyzyjny dobór grupy badanej oraz nowoczesny warsztat diagnostyczny, co dodatkowo podnosi wartość ocenianej pracy. Na zakończenie należy podkreślić niezwykle staranne i praktycznie bezbłędne przygotowanie przez doktoranta rozprawy pod względem redakcyjnym. Jedyne błęd edytorski jaki udało się dostrzec recenzentowi znajduje się na stronie 44 wiersz 22 i dotyczy nieprawidłowego tłumaczenia na język angielski polskiego wyrazu materiał.

Podsumowując uważam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska lekarza Piotra Barana nt:” „Ocena stężeń cytokin u kobiet ciężarnych z przedwczesnym pęknięciem błon płodowych” w pełni odpowiada merytorycznym i formalnym wymogom stawianym pracom na stopień doktora nauk medycznych określonych w artykuie 11 ustawy o tytułach naukowych i stopniach naukowych. Przeprowadzone badania ich wartość naukowa i przydatność kliniczna oraz dojrzałość wywodu naukowego sprawiają, że praca jest bardzo interesująca i cenna również pod względem praktycznym.

Mam zatem zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Wydziału Lekarskiego I Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu wnioszek o dopuszczenie lekarza Piotra Barana do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. n. med. Prof. UJK Wojciech Rokita  
specjalista położnictwa i ginekologii  
specjalista ginekologii  
57 800 000

