



Dr hab. n. med. Michał Ciebiera, Prof. CMKP

Warszawa 18.08.2023

p.o. Kierownika

II Klinika Położnictwa i Ginekologii

Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego w Warszawie

Warszawski Instytut Zdrowia Kobiet

**Recenzja rozprawy doktorskiej lek. Aleksandry Krokockiej pt.
„Udział wybranych metaloproteinaz i prolidazy w występowaniu zjawiska
przedwczesnego pęknięcia błon płodowych u kobiet ciężarnych”**

Rozprawa napisana pod kierownictwem Promotora

dr hab. n. med. Miłosza Wilczyńskiego, prof. Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki

Pęcherz płodowy, uformowany przez błony płodowe, pełni kluczowe funkcje dla przebiegu ciąży i jest środowiskiem rozwoju dziecka. Płyn owodniowy znajdujący się w tym pęcherzu, a otaczający rozwijający się płód, ma znaczenie w jego wzrastaniu i rozwoju płuc. Uszkodzenie i rozerwanie tego pęcherza w nieodpowiednim czasie może stanowić w różnym stopniu zagrożenie dla płodu jak i dla matki. U pacjentek obserwuje się wtedy z reguły wyciek płynu, zwiększenie ilości i zmiany jakości wydzieliny z pochwy, niekiedy można również zaobserwować epizody krwawienia.

Przedwczesne odpłynięcie płynu owodniowego (z ang. premature rupture of membranes - PROM) oznacza przedwczesne rozerwanie się błon płodowych połączone często z wyciekaniem płynu owodniowego i wystąpieniem regularnej czynności skurczowej. Czynniki, które sprzyjają wystąpieniu takiej sytuacji to infekcje/zapalenia pęcherza moczowego, krwawienia z dróg rodnych, zabiegi inwazyjne na macicy, niski status socjalnoekonomiczny matki, palenie wyrobów tytoniowych w ciąży i inne.

Przedwczesne pęknięcie błon płodowych komplikuje ok. 3% ciąż i odpowiada za znaczną część przedwczesnych porodów. Przedwczesne pęknięcie błon płodowych obarczone jest ryzykiem wystąpienia zakażenia wewnątrzowodniowego, przedwczesnego



oddzielenia się łożyska, niedotlenienia i wystąpienia różnych deformacji płodu, a ostatecznie nawet śmiercią. Przedwczesne pęknięcie błon płodowych w ciąży niedonoszonej (z ang. preterm PROM – PPRM) jest jeszcze trudniejszym przypadkiem. Wcześnieactwo przez nie powodowane jest głównym zagrożeniem dla szans przeżycia i rozwoju płodu, ale i także ogromnym zagrożeniem dla matki. Im wcześniej dojdzie do pęknięcia pęcherza płodowego u matki, tym większe staje się ryzyko zachorowania i śmiertelności dla obojga. Sprawia to, że staranna opieka lekarska jest tak ważna przy wystąpieniu tego typu powikłania w ciąży.

Wydawać by się mogło, że to dość częste powikłanie nie stanowi problemu diagnostycznego dla lekarzy zajmujących się patologią ciąży i położnictwem, jednak nic bardziej mylnego. W niektórych przypadkach istnieją duże trudności w rozpoznaniu tego stanu, a dodatkowo przewidywanie możliwości wystąpienia tego zjawiska jest w ogóle tematem słabo zbadanym i dalej enigmatycznym. Z uwagi na częstość występowania i znamienne skutki PROM/PPROM rozprawa doktorska lek. Aleksandry Krokockiej, która skoncentrowała się na próbie ustalenia czy i które metaloproteinazy mają udział w powstawaniu i przewidywaniu zjawiska PROM, dobrze wpasowuje się w obszar istotniejszych zagadnień z zakresu perinatologii i na pewno będzie źródłem wiedzy dla zainteresowanych tematem.

Recenzowana przeze mnie praca obejmuje 152 strony wydruku komputerowego i zawiera klasyczne części, tj. wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję oraz wnioski. Autorka pracy przedstawiła aż 240 pozycji piśmiennictwa, które pomagało jej w przygotowaniu tego opracowania. Piśmiennictwo zostało dobrze dobrane tematycznie, aczkolwiek mogłoby być bardziej aktualne, ponieważ tak naprawdę tylko kilka pozycji z tych 240 zostało opublikowanych po 2016 roku. Uzupełnienie tej pracy składa się aż z 30 tabel i 31 rycin. Całość pracy jest raczej przejrzysta i w większej części czytelna.

We wstępie Doktorantka omawia tematykę przedwczesnego pęknięcia błon płodowych wraz z aspektami epidemiologicznymi oraz patofizjologicznymi. Następnie przechodzi do różnych form postępowania klinicznego w przypadkach występowania tego powikłania, kolejno opisuje dokładnie błony płodowe jako element jaja płodowego, a następnie wyczerpująco omawia tematykę metaloproteinaz i ich rolę w procesach



związanych z przedwczesnym pęknięciem błon płodowych.

Założenia i cele pracy w mojej opinii są sformułowane w sposób czytelny i uzasadniają celowość przeprowadzonych badań. W tym miejscu brakuje jednak informacji dlaczego akurat konkretne metaloproteinazy zostały wytypowane a inne nie i może to nieco zmylić czytelnika, aczkolwiek ten temat jest opisywany w innym miejscu opracowania. Doktorantka w swojej pracy postanowiła określić czynniki degradujące macierz zewnątrzkomórkową błon płodowych oraz sprawdzić czy produkty wybranych genów mogą stanowić pewnego rodzaju biomarkery dla przedwczesnego pęknięcia błon płodowych. Cele szczegółowe określone przez nią miały na celu określić różne stopnie ekspresji oraz stężenia wybranych metaloproteinaz w pewnych grupach pacjentek ciężarnych. O tyle mam uwagę do celu głównego, że jest postawiony nieco zbyt śmiało, ponieważ sama praca doktorska jest tylko pewnym urywkiem pełnej wiedzy w tym temacie.

Zgodnie z informacjami podanymi w tekście materiałem dla pracy doktorskiej jest grupa 98 ciężarnych, które były pacjentkami Kliniki Położnictwa i Ginekologii Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi od 07.2014 do 12.2015 roku. Omówienie wyników pracy zajmuje kilkadziesiąt stron opracowania i jest uzupełnione licznymi rycinami i tabelami. Większość metodyki jest czytelna i nie wymaga żadnej uwagi, ale moją uwagę zwraca tu zdanie, że w badaniu wykluczono choroby infekcyjne na podstawie badania podmiotowego i przedmiotowego. O tyle byłbym ostrożny w takim twierdzeniu bo nie dość, że część pęknięć błon płodowych wynika właśnie z pewnego rodzaju mechanizmu infekcyjnego, a po drugie na pewno samo badanie podmiotowe i przedmiotowe nie pozwala kompletnie wykluczyć chorób infekcyjnych. Zaciekały mnie też zaprezentowane na stronie 43 schematy antybiotykoterapii, które różnią się od tych prezentowanych we wstępie i podawanych w dostępnych rekomendacjach.

Rozprawa prezentuje uporządkowany ciąg kolejnych analiz dotyczących stężeń metaloproteinaz w surowicy oraz ekspresji genów metaloproteinaz u badanych pacjentek. Sama sekcja opisująca zastosowane analizy statystyczne przejrzysto je opisuje z uwzględnieniem oceny rozkładu oraz odpowiednim doбором testów. Wydaje mi się jednak, że nieco lepiej można byłoby dobrać metody wizualizacji wyników. Wykresy



kołowe w wybranej formie przestrzennej utrudniają interpretację prezentowanych danych wskutek zniekształcenia stosunku pól powierzchni, bardziej czytelne pewnie byłyby tu wykresy dwuwymiarowe lub słupkowe. Z bardziej szczegółowych rzeczy pragnę zwrócić uwagę, że w opisie Tabeli 12 oraz Tabeli 13, analizującej zmiany stopnia ekspresji nie wspomniano, czy zastosowany test uwzględniał poprawkę na porównania wielokrotne. Wspomniane tabele nie precyzują w dostatecznym stopniu, do jakiego rodzaju porównań się odnoszą. Oceniając analizę statystyczną nasuwa się pytanie, czy nie rozsądniej byłoby zastosować metody porównywania grupy badanej do 3 podgrup grupy kontrolnej z zastosowaniem analizy wariancji, która jest bardziej adekwatną metodą niż wielokrotne wykonywanie testu Manna-Whitney'a na parach grup, co zwiększa prawdopodobieństwo błędnego przyjęcia hipotezy alternatywnej jako prawdziwej. Kolejnym punktem analizy, gdzie można ewentualnie mieć uwagi są wykresy rozrzutu z Ryciny 4. Przedstawiono na nich prostą dopasowania liniowego, której przebieg typowo w oprogramowaniu statystycznym jest efektem budowy ogólnego modelu liniowego, wymagającego normalności rozkładu i jednocześnie wrażliwego na wartości odstające. Na każdym z prezentowanych wykresów zauważyć można znacząco odstające punkty, które mogły istotnie wpływać na przesunięcie oraz nachylenie linii. Do analizy korelacji autorka posłużyła się metodą nieparametryczną Spearmana, która jest relatywnie odporna na wartości odstające, wskutek czego nie zaburzają one w mojej opinii wyników pracy.

Dyskusja w rozprawie poprowadzona jest w większej części dość ciekawie. Doktorantka w miarę ostrożnie interpretuje wyniki odnosząc je do dobrego jakościowo, ale jednak już częściowo nieaktualnego piśmiennictwa. Uzyskane wyniki stanowią swoisty wkład w zagadnienie problematyki przedwczesnego pęknięcia błon płodowych. Pomimo upływu lat powikłanie to jest w wielu przypadkach kompletnie nieprzewidywalnym a niosącym bardzo poważne skutki, łącznie z obumarciem płodu lub stanem zagrożenia życia matki. Analizując kolejne akapity rozprawy można odnieść wrażenie, że Doktorantka interesuje się tematem i posiada umiejętność do planowania badania, analizowania wyników i określania ich znaczenia. Wydaje mi się jednak, że pojawiające się przykładowo na stronach 100 i 101 twierdzenia bardzo pewne typu „jest związane”, „wskazuje” raczej proponowałbym formułować nieco ostrożniej, np. „może



być związane”, bo w mojej opinii grupa 98 pacjentek nie pozwala na takie pewne twierdzenia i wymaga dodatkowych analiz. To wszystko dotyczy też kwestii wniosków, a na pewno wniosków 2, 3, 6, 7 czy choćby 8.

W ogóle z zalet pracy doktorskiej chciałbym wymienić jeszcze choć część. Jako osoba zainteresowana patofizjologią w ogóle, z dużą ciekawością przeczytałem dobrze napisany rozdział dotyczący metaloproteinaz, jest to dobre opracowanie wiedzy w tym temacie, z którego sam skorzystałem. Wprowadzone w pierwszej części ryciny ułatwiają zrozumienie pewnych aspektów, aż szkoda że nie ma ich więcej. Kolejno raczej sztywne kryteria włączenia i wyłączenia pozwoliły na uzyskanie w miarę jednorodnej grupy pacjentek oraz krótki czas na włączenie do badania co na pewno zmniejsza błąd wynikający z rozwoju reakcji zapalnej. Na pochwałę zasługuje też szczegółowe opracowanie planu badania i stworzenie dobrych układów porównujących grupę badaną z poszczególnymi grupami kontrolnymi. Pozwoliło to np. na stworzenie układu umożliwiającego ocenę zaangażowania wybranych metaloproteinaz w patomechanizm przedwczesnego odpływania płynu owodniowego w porównaniu z porodem, który zaczął się od czynności skurczowej. Dodatkowo układ badania pozwala też na możliwość oceny zmian zachodzących wśród metaloproteinaz w czasie ciąży czy, ocena które z metaloproteinaz są najistotniejsze z punktu widzenia pęknięcia pęcherza płodowego w trakcie porodu. Rozprawa doktorska lek. Aleksandry Krokockiej na pewno istotnie wzbogaciła piśmiennictwo krajowe i zagraniczne w kwestii patofizjologii ciąży powikłanych nieprawidłowym czasem odpłynięcia płynu owodniowego, w szczególności z uwagi na wykazanie kilku ciekawych zależności. Dodatkowo analiza krzywych wykazała potencjalną przydatność oceny stężenia metaloproteinazy 8 w ewentualnym wykrywaniu wystąpienia czynności skurczowej związanej z jednoczasowym pęknięciem błon płodowych.

Co do uwag to ich część była poruszana nieco wyżej. W tym miejscu chcę jeszcze zwrócić uwagę na kilka spraw, ale bardziej pod kątem rad na przyszłość. Niezależnie od niezbyt dużej grupy badanej istnieje dysproporcja w liczbie uczestniczek w omawianych grupach. Kolejno ocena ekspresji genów dla konkretnych metaloproteinaz w błonach płodowych odbywa się w nich jako w całości a nie w konkretnych warstwach. W kwestii



samej oceny samego wydruku, dostrzegam pewną ilość błędów edycyjnych, np. podwójne spacje, braki spacji, mieszanie czcionek (jak choćby w na str. 1), czy po prostu literówki, ale zdaję sobie sprawę jak przed tym ciężko jest się ogólnie uchronić. Największy kłopot sprawił mi układ i sposób wprowadzania piśmiennictwa, którego nie do końca rozumiem. W mojej opinii numery są jakby losowe, być może wynika to z jakiegoś edytora do referencji, ale jednak taki układ maksymalnie utrudnia czytelnikowi przechodzenie przez kolejne strony tekstu i sprawia, że tekst czyta się znacznie dłużej. Zdarzają się też fragmenty, jak choćby na stronie 8, gdzie przytaczane jest wiele danych bez podania przypisów przez co nie można sprawdzić z jakiego źródła Doktorantka korzystała, przykładem jest strona wstępu opisująca szereg interleukin i cytokin, jak i np. kryteria zakażenia. Dodatkowo, pojawia się dublowanie piśmiennictwa, np. pozycje 63 i 64. Ostatnie uwagi wynikają z tej kwestii nieaktualności piśmiennictwa. Doktorantka podaje przykłady użytecznych metod jak test krystalizacji płynu owodniowego, którego większość klinicystów nigdy nie widziała w swojej praktyce. Dodatkowo w samej kwestii już akurat nowoczesnych testów Doktorantka niepotrzebnie podaje konkretną markę testu a nie rodzaj badanego białka, co też zastanawiające wymienia tylko test wykrywający α -1-mikroglobulinę łożyskową w ogóle nie wspominając o teście na wykrywanie białka wiążącego insulinopodobny czynnik wzrostu 1. W badaniach laboratoryjnych poza samym białkiem C-reaktywnym Doktorantka nie wspomina nic o prokalcytoninie, czy interleukinie 6-tej. W metodach diagnostyki płynu owodniowego autorka podaje tylko indeks płynu owodniowego (AFI), nie uwzględniając w ogóle najgłębszej kieszonki płynowej. Przykłady zastosowania starszego piśmiennictwa wychodzą też w pewnych kwestiach klinicznych – jak choćby indukcja w 34 tygodniu ciąży. Nie odzwierciedla to aktualnych wytycznych Polskiego Towarzystwa Ginekologów i Położników. Zdezaktualizowane są też dane o schematach antybiotykoterapii, gdzie aktualnie z powodu braków erytromycyny szeroko weszła azytromycyna. Na stronie 19 Doktorantka przytacza niedostępne już online wytyczne RCOGu i ACOGu. Podobnie dla przykładu jest w przypadku cytowanego przeglądu Cochrane na stronie 20. Chcę podkreślić, że nie są to uwagi co do samej analizy, bo ta jest ciekawa i nowoczesna, a raczej rada na co zwrócić uwagę podczas przygotowywania dalszych opracowań.



Podsumowując powyższe, pracę oceniam pozytywnie. Doktorantka wykazała się znajomością tematu stanowiącego przedmiot recenzowanej rozprawy, a także wykazała się umiejętnością przeprowadzenia analizy statystycznej oraz wyciągnięcia z niej wniosków. Potwierdza to według mnie fakt, że Doktorantka jest przygotowana do prowadzenia i rozwijania swojego warsztatu w badaniach naukowych.

Stwierdzam na tej podstawie, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska lek. Aleksandry Krokockiej pt. „Udział wybranych metaloproteinaz i prolidazy w występowaniu zjawiska przedwczesnego pęknięcia błon płodowych u kobiet ciężarnych” spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim określonym w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. W związku z tym mam wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki o dopuszczenie lek. Aleksandry Krokockiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

p.o. Kierownika
II Kliniki Położnictwa i Ginekologii
Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego

dr hab. n. med. Michał Ciebiera, prof. CMKP