

Katowice, 22.06.2022

Dr hab. n. med. Krzysztof Nowosielski, prof. SUM
Katedra i Klinika Ginekologii i Położnictwa
Uniwersyteckie Centrum Kliniczne
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach,
Ul. Medyków 14
40-752 Katowice

Ocena rozprawy

„Wpływ hormonów płciowych na cząsteczki kontrolujące układ opornościowy u kobiet dotkniętych problemem poronień oraz rodzących bez komplikacji”

autorstwa **mgr Michała Zych**

na stopień doktora nauk farmaceutycznych

Poronienia nawykowe stanowią obecnie wyzwanie dla współczesnej ginekologii i położnictwa. Brak jest nadal danych naukowych opartych na wiarygodnych badaniach klinicznych i doświadczalnych, które wyjaśniają przyczyny poronień. Brak jest również skutecznych metod leczenia tych poronień, których etiologii nie da się wyjaśnić (ich odsetek może sięgać nawet 50%). Tak sytuacja implikuje dwa główne działania: z jednej strony, klinicznej, unikanie wykonywania nierekomendowanych badań i stosowania niesprawdzonych terapii u par dotkniętych poronieniami nawykowymi, z drugiej, naukowej, stymuluje do prac badawczych zmierzających do ustalenia nowych czynników mogących odpowiadać za utraty ciąży do 22 tygodnia. Niniejsza rozprawa doktorska wypełnia właśnie to drugie działanie.

Na wstępie należy podkreślić, iż autorem poddanej ocenie dysertacji jest osoba niebędąca lekarzem, a więc nie mogąca naturalnie posiadać rozległej wiedzy klinicznej dotyczącej poronień nawykowych. Dlatego też niektóre krytyczne uwagi, które dotyczą właśnie problemów medycznych ujętych w rozprawie, powinny być traktowane jako pomocne w redagowaniu prac naukowych przygotowywanych do publikacji w czasopiśmie w dziedzinie ginekologii i położnictwa.

Przedstawiona do recenzji rozprawa ma typowy układ rozpraw doktorskich. Dysertacja liczy 213 stron i jest częścią projektu finansowanego w ramach grantu młodego badacza nr MB/M/32(57).

W początkowej części autor zawarł spis treści, wykaz skrótów oraz streszczenia w języku polskim i angielskim.

W niesłuchanie rozległym wstępie autor opisuje znaczenie poszczególnych cząstek kontrolujących układ odpornościowy oraz ich rolę w procesach nowotworowych oraz w ciąży i przebiegu prawidłowym i powikłanych. Autor opisuje również wpływ hormonów na funkcjonowanie człowieka oraz w mniejszym stopniu na układ immunologiczny.

Cel pracy został poprawie sformułowany i koresponduje z dalszymi częściami rozprawy.

Materiał i metodyka zawierają zwięzły opis grup badanych i kontrolnej z analizą podstawowych danych medycznych (wiek, BMI, historia reprodukcyjna). W dalszej części autor przedstawia metodologię cytometrii i pozostałych oznaczeń, w tym testu immunologicznego Luminex, a następnie omawia metodologię wyznaczenia stężenia hormonów do hodowli oraz metodykę hodowli komórek i oceny wpływu różnych stężeń na ekspresję badanych ICP. W końcowej części tego rozdziału autor przedstawia informacje na temat użytych testów statystycznych.

W kolejnej części autor prezentuje w niezwykle wnikliwy sposób wyniki swoich badań ilustrując je licznymi rycinami i tabelami, co dodatkowo ułatwia zrozumienie tego trudnego tematu. Bardzo dobrym pomysłem było podsumowanie poszczególnych uzyskanych wyników w jednej zbiorczej tabeli, co znacznie podnosi wartość merytoryczną pracy.

W następnej części – Dyskusja – autor porównuje uzyskane przez siebie wyniki z innymi badaniami dotyczącymi immunologii poronień nawykowych. Należy podkreślić, iż dyskusja ma rzeczywiście charakter polemiki z wynikami innych autorów i próby znalezienie przyczyn rozbieżności (dotyczy rozważań immunologicznych, nie klinicznych – wyjaśnienia w uwagach).

W części „Wnioski” autor podejmuje próbę zebrania uzyskanych wyników w ramy uogólnionych stwierdzeń, które stanowiłyby odpowiedź na pytania postawione w części „Cel pracy”. Ta część wymaga jedna gruntownych zmian (szczegóły w uwagach).

W części „Bibliografia” doktorant zamieszcza 318 pozycji literaturowych, w tym jedną książkową, a pozostałe stanowią artykuły w punktowanych czasopismach medycznych. Znacząca większość to artykuły przed mniej niż 10 lat (178 pozycji). Literatura została dobrze dobrano i stanowi przegląd piśmiennictwa dotyczącego omawianego tematu.

Ostatnia część zwraca spis tabel oraz zgodę Komisji Bioetycznej.

UWAGI.

Należy wyraźnie podkreślić, iż recenzowana dysertacja stanowi cenną pracę badawczą, która, w niedalekiej przyszłości, może posłużyć do zaprojektowania badań klinicznych mogących zmienić podejście do diagnostyki i leczenia poronień nawykowych. Droga to tego jeszcze daleka, ale takie badania przecierają pierwsze szlaki. Czas pokaże, czy jest to właściwa droga czy raczej ślepa ścieżka. W tym kontekście poniższe uwagi mają na celu poprawę części medycznej pracy tak aby była jeszcze bardziej atrakcyjna dla potencjalnego czytelnika.

1. W spisie rycin brakuje ryciny nr 1 opisanej na stornie 21
2. W wykazie skrótów niepoprawnie zdefiniowano skrót: ICP – powinno być Immunologiczne Punkty Kontroli; iNOS – powinno być indukowana Syntaza Tlenku Azotu; PD1 – powinno być Białko programowanej Śmierci Komórki 1
3. W streszczeniu w języku polskim. W pierwszym paragrafie użyto stwierdzenia „w tym samym stosunku partnerskim” – powinno być „z tym samym partnerem”. W paragrafie drugim na stornie 16 zawarto nieściśle informacje dotyczące leczenia poronień nawykowych. Warto tu odnieść się do rekomendacji ESHRE (<https://www.eshre.eu/Guidelines-and-Legal/Guidelines/Recurrent-pregnancy-loss.aspx>), NICE (<https://www.nice.org.uk/guidance/ng126/chapter/Recommendations#management-of-miscarriage>) czy analizy Cochrane z 2019 roku (Haas DM, Hathaway TJ, Ramsey PS. Progesterone for preventing miscarriage in women with recurrent miscarriage of unclear etiology. Cochrane Database of Systematic Reviews 2019, Issue 11. Art. No.: CD003511. DOI: 10.1002/14651858.CD003511.pub5.) i opracowania Gue i Lu (Guo H, Lu Q. Efficacy of dydrogesterone on treating recurrent miscarriage and its influence on immune factors: a systematic review and meta-analysis. Ann Palliat Med. 2021 Oct;10(10):10971-10985. doi: 10.21037/apm-21-2605). W materiale i metodach nie podano liczebności poszczególnych grup oraz ilości pobranej do badania krwi. Wyniki omówione są zbyt ogólnie, bez żadnych danych liczbowych. Brak jest również analizy ograniczeń prowadzonych badań oraz implikacji klinicznych, a wnioski są bardzo ogólne i dotyczą nie samych wyników a tego, do czego mogą posłużyć w przyszłości. Ponadto, na chwilę obecną brak jest możliwości terapii zaburzeń immunologicznych, a

przy niepotwierdzonej skuteczności terapii progesteronem (nie ma na chwilę obecną danych na temat terapii estradiolem i DHT) u bezobjawowych pacjentek, trudno snuć dalekosiężne palny odnośnie przydatności uzyskanych wyników. Warto popracować nad tym, aby wnioski wynikały z analizy uzyskanych wyników, np.: liczba określonych komórek jest wyższa a ekspresja określonych cząsteczek wyższa u kobiet z poronieniami nawykowymi, itd.

4. We wstępie autor zbyt szczegółowo omawia wszystkie elementy układu odpornościowego, szczególnie w aspekcie procesów onkologicznych. Wprawdzie ilość pracy włożonej w napisanie tej części jest ogromna, niemniej prowadzi to dezorientacji czytelnika. Warto by było skupić się na roli układu immunologicznego w procesie implantacji i utrzymania homeostazy immunologicznej w ciąży. Dopiero na stronie 40 w rozdziale 1.3 napotykamy taki właśnie opis, ale jest on bardzo ogólny (a szkoda, bo badania w tym aspekcie są dość szczegółowe – np. w Abu-Raya B, Michalski C, Sadarangani M, Lavoie PM. Maternal Immunological Adaptation During Normal Pregnancy. *Front Immunol.* 2020;11:575197. Published 2020 Oct 7. doi:10.3389/fimmu.2020.575197). Na stronie 44 znalazło się określenie w ciążyach patologicznych – warto wyjaśnić o co dokładnie chodzi (nota bene takie ciążę są nazywana ciążami wysokiego ryzyka albo powikłanymi).

Na stronie 45 brak wyjaśnienia skrótu „KIR+”. Na tej samej stronie znaleźć można sformułowanie „progesteron wydaje się być atrakcyjną terapią farmakologiczną...i często jest podawany u kobiet zagrożonych powikłaniami ciążami”. Takie stwierdzenie jest zbyt lakoniczne i wymaga wyjaśnień w kontekście rekomendacji ACOG, RCOG, PTGiP oraz ESHRE.

W rozdziale 1.4.2 autor bardzo szczegółowo opisuje rolę estrogenów w wielu procesach immunologicznych, ale brak jest dokładnego opisu jego roli w ciąży. W kolejnym rozdziale o DHT zbyt wiele uwagi poświęca się nieistotnym z punktu widzenia dysertacji kwestiom (zmiany u mężczyzn; zdanie „kobiety są również bardziej wrażliwe na działanie testosteronu i jego pochodnych” nie jest zgodne z obecnym stanem wiedzy – siła działania zależy od polimorfizmu CAG receptora dla androgenów a nie od samego faktu bycia kobietą).

Na stronie 49 sformułowanie „ablacja androgenu poprzez kastrację” jest niezrozumiałe – powinno być raczej „spadek stężenia androgenów wynikający z kastracji”.

Na stronie 50 brak jest wyjaśnienia skrótu „EAE”. W tym rozdziale brak jest informacji o wpływie DHT i T na implantację oraz rozwój ciąży.

W rozdziale 1.5 powinno znaleźć się wyjaśnienie o różnych definicjach poronień nawykowych (lub w rozdziale Ograniczenia badania).

Rozdział 1.5.1. „Przyczyny poronień” zawiera wiele niezgodnych z EBM informacji: MTHFR nie jest obecnie uznawane za przyczynę poronień nawykowych a mutacja ta nie wymaga leczenia (jeśli występuje w układzie heterozygotycznym). Podobnie nie rekomenduje się obecnie oznaczania przeciwciał przeciwdądrowych, przeciwplemnkowych, antygenów HLA, czy infekcji z grupy TORCH w diagnostyce poronień nawykowych. Ta część wymaga gruntownych poprawek w oparciu o wspomniane wcześniej rekomendacje NICE, ACOG, ESHRE i PTGiP (podsumowanie można znaleźć w artykule Poronienia nawykowe Ginekologia po Dyplomie 2020- Postępowanie w poronieniach nawykowych – co o tym wiemy w 2020 roku - <https://podyplomie.pl/ginekologia/35459,postepowanie-w-poronieniach-nawykowych-co-o-tym-wiemy-w-2020-roku.>)

5. W rozdziale 5.1 brak jest informacji jakie badania krwi zostały wykonane u pacjentek. Nie podano informacji w którym tygodniu doszło do poronienia, a w kontekście zmian ICP i rozpuszczalnych markerów w trakcie ciąży, ten właśnie parametr może mieć

wpływ na uzyskane wyniki badania. W tej części na wykresach oraz w tabelach brakuje wartości p, a także wartości procentowych (są tylko wartości liczbowe). Kryteria włączenia i wyłączenia są niejasne, nie podano miejsca, gdzie rekrutowana pacjentki oraz czasu, w którym prowadzono badania. Dane dotyczące objawów prodromalnych w ciąży wydają się nie mieć większego związku z tematem pracy i mogłyby zostać pominięte. Brak jest informacji z jakiej żyły i ile krwi zostało pobrane od każdej pacjentki. W tej części, podobnie jak używa formy „zebraliśmy” zamiast „zebrano” czy „zebrałem” (analogicznie na stronie 141 – „nasze” zamiast „moje”). W rozdziale 3.3.1. „Cytometria przepływowa” zawarto niesłychanie szczegółowe informacje o metodzie, które jednak mogłyby być bardziej „przystępne”. Nie podano również jak dokładnie izolowano badane komórki – te informacje można jednak znaleźć w części Wyniki. Brak jest w tej części (podrozdział 3.3.3) wyjaśnienia skrótu PBMC. Podrozdział 3.3.13 warto uzupełnić o informację o producencie programów użytych do analizy statystycznej.

6. W części „Wyniki”, w podrozdziale 4.1.1 (strona 92) autor zawarł stwierdzenie „monitorowanie wybranych cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy u kobiet z poronieniami nawykowymi odpowiednia reakcja farmakologiczna (...) mogłyby przyczynić się do zmniejszenia ryzyka poronienia”. Takie stwierdzenie jest nieco przedwczesne – badania przeprowadzone na grupie kilkunastu osób nie dają podstawy do takiego wniosku. Dodatkowo nie wiemy jakie byłyby koszty badań ICP, a przede wszystkim metody leczenia (być może progesteron, ale tu nie wiemy w jakich dawkach, a współczesne badania nie potwierdzają jednoznacznie jego roli w zapobieganiu poronieniom nawykowym; analiza Cochrane wykazała zmniejszenie ryzyka kolejnego poronienia ale rekomendacje towarzystw naukowych nie są zgodne co do rekomendowania progestagenów u bezobjawowych pacjentek z poronieniami nawykowymi). Podobnie na stronie 99 autor pisze „Wykryte różnice mogą posłużyć jako marker w ocenie ryzyka wystąpienia poronienia, co być może pozwoli na przewidywanie lub wykrywanie procesów patologicznych podczas rozwoju ciąży”; stwierdzenie przedwczesne, brak analizy ekonomicznej (cost-effectiveness) i brak skutecznego leczenia na chwilę obecną. W tym samym akapicie czytamy, iż „wczesne wykrycie niepokojących zmian mogłoby pozwolić na wdrożenie leczenia (...)” – kiedy, jakiego, i czy będzie ono skuteczne. Tego już autor nie podaje. W tym kontekście recenzent proponuje przenieść takie rozważania do nowego rozdziału np. Implikacje kliniczne lub Obszar przyszłych badań.
7. W bardzo rozległym rozdziale Dyskusja (zawiera aż 40 stron), autor odnosi się nie tylko do ICP w ciąży, ale omawia, zupełnie niepotrzebnie, inne nieistotne kwestie. Widać do dokładnie w podrozdziale 5.3.1 – mówi o roli progesteronu (pierwszy akapit) a ma na myśli jego pochodne (np. sam progesteron jest przeciwwskazany w leczeniu raka endometrium). Nie można równocześnie zgodzić się, iż podawanie doustnie i dopochwowo progesteronu zmniejsz odsetek poronień nawykowych – te informacje dotyczą stosowania progesteronu po zapłodnieniu in vitro – autor powinien zwracać większą uwagę na kontekst podawanych informacji. Podobnie informacje na stronie 160, w szczególności dotyczące niedomogi lutealnej, są sprzeczne z rekomendacjami ESHRE, NICE, ACOG i PTGiP. Na stronie 160 autor pisze „Przeprowadzone badania mogą stanowić wyjaśnienia w jaki sposób podawanie progesterony kobietom z poronieniami nawykowymi wpływa na funkcjonowanie układu odpornościowego” – to znów nieco przedwczesne stwierdzenie. A dodatkowo, badania nad wpływem progesteronu były już przeprowadzane i pewne mechanizmy jego działania, przynajmniej po części, są znane.

W dalszej części na stronie 167 autor podaje, zupełnie niepotrzebnie, informacje o stosowaniu estrogenów w hormonalnej terapii zastępczej (nota bene obecnie używa się terminu „terapia hormonalna okresu menopauzy” – MHT). Cytuje również badania Elguero, które dotyczą rozrodu wspomaganego a nie leczenia poronień nawykowych – a to zasadnicza różnica. Całości dopełnia cytacja badania prowadzonego w Egipcie, gdzie, wbrew temu co napisał autor dysertacji, stosuje się estradiol i mizoprostol NIE w zapobieganiu poronieniom nawykowym, ale w INDUCJI PORONIENIA !!!!. To niestety wykazują brak zrozumienia tematu poronień i indukcji poronienia. Na usprawiedliwienie można dodać, iż doktorant nie posiada wykształcenia lekarskiego, co jednak, nie zwalnia go od odpowiedzialności za rzetelne przedstawianie wyników badań innych autorów.

Na stronie 167 autor pisze także „Zastosowanie hormonalnie terapii zastępczej powoduje odwrócenie tego zjawiska (stymulacja produkcji cytokin prozapalnych przy niskich stężeniach estradiolu) – trudno się z tym zgodzić, dlatego warto poprosić Doktoranta o opatrzenie tego zdania odpowiednią cytacją.

W kolejnym rozdziale 5.3.3 podobnie autor rozwodzi się nad rolą DHT w regulacji odpowiedzi seksualnej u kobiet i mężczyzn. Ta część jest zupełnie nieistotna w kontekście tematy dysertacji zwłaszcza, iż podaje błędne informacje i stosuje nieaktualną terminologię (recenzent jest również seksuologiem i ma rozległą wiedzę w tej materii).

W tej części zabrakło natomiast informacji na temat różnic w ekspresji ICP oraz ich koncentracji w zależności od tego, jaka populację reprezentują (doczesnowe vs peryferyjne). Należy tu rozumieć, iż ze względu na porównanie również z grupą kobiet nie będących w ciąży, wybór tych peryferyjnych komórek był celowy. Ciekawe, czy ekspresja ICP, ilość tych komórek oraz ich reakcja na egzogenne hormony byłyby inne niż opisane, gdyby wyekstrahować frakcje doczesnową np. NK czy limfocytów T CD8+. Byłoby to zapewne ciekawe z punktu widzenia naukowego podejście do tematu. Zabrakło również informacji na temat klinicznego znaczenia stężenia progesteronu 500ng/ml. Jakie dawki progestagenów i w jakiej formie musiałyby być podane, żeby uzyskać takie wartości lub taki sam, a przynajmniej zbliżony efekt na poziomie ekspresji partykuł na komórkach kompetentnych immunologicznie.

Podsumowując – w dyskusji autor niezwykle często odnosi się do nieistotnych kwestii pobocznych zamiast skupiać się na meritum sprawy. Niestety ta część wykazała znaczące braki w wiedzy medycznej z zakresu omawianego tematu, choć wiedza z zakresu immunologii jest rzeczywiście imponująca.

8. W rozdziale „Wnioski” Doktorant powtarza wyniki – ten rozdział nie zawiera podsumowania, które opowiadałoby na postawione cele badania. Część ta powinna być gruntownie przeredagowana.
9. W części „Bibliografia” można kilka pozycji wydaje się już mało aktualnych jak pozycja 137 z 1990 roku. Warto zastanowić się nad ich usunięciem. Brakuje również cytowanych przez recenzenta rekomendacji i zaleceń towarzystw naukowych.
10. Warto by dodać podrozdział o ograniczeniach badania (np. mała liczba badanych, oznaczenie komórek peryferyjnych a nie doczesnowych) oraz potencjalne implikacje kliniczne.

Wnioski końcowe

Doktorant wybrał aktualny, interesujący i ważny z klinicznego punktu widzenia temat badawczy, choć dla „przeciętnego” lekarza czy farmaceuty niezwykle trudny w percepcji i interpretacji. Efektem pracy Doktoranta jest poprawna merytorycznie dysertacja doktorska nie

pozbawiona jednak błędów wnikających głównie z braku doświadczenia klinicznego, niepodjęcia próby translacji uzyskanych wyników na praktykę kliniczną oraz niewłaściwej interpretacji części wyników badań innych autorów. Pomimo tych niedociągnięć, dysertację należy ocenić pozytywnie, przede wszystkim za ogrom włożonej pracy oraz skłanianie do refleksji nad dalszymi badaniami w materii znaczenia immunologicznych punktów kontroli w diagnostyce i szacowaniu ryzyka poronień nawykowych. Biorąc pod uwagę całość pracy Doktoranta stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art.187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1688) i tym samym jest podstawą do ubiegania się o stopień naukowy doktora. Przedkładam zatem Wysokiej Radzie wniosek o dopuszczenie mgr Michała Zych do dalszych części przewodu doktorskiego.