UCK WUM

UNIWERSYTECKIE CENTRUM KLINICZNE
WARSZAWSKIEGO UNIWERSYTETU MEDYCZNEGO
Dziecięcy Szpital Kliniczny
im. Józefa Polikarpa Brudzińskiego w Warszawie

ODDZIAŁ KLINICZNY POŁOŻNICTWA, PERINATOLOGII I GINEKOLOGII

dr hab. n. med. Przemysław Kosiński
Klinika Położnictwa, Perinatologii i Ginekologii
Warszawski Uniwersytet Medyczny

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Ewy Paszkowskiej:

„Wykorzystanie metabolomiki w badaniach prenatalnych płodowego zespołu Downa"

Właściwe leczenie chorób oraz poprawa jakości życia osób z różnymi problemami medycznymi jest możliwa tylko wtedy, gdy udaje się w sposób prawidłowy postawić diagnozę medyczną. W tym procesie niezbędny jest nie jeden człowiek, a cały zespół zaangażowany w proces diagnostyki różnicowej, badań laboratoryjnych, badań obrazowych i wielu innych procedur i testów. Dzięki naukowemu zaangażowaniu wielu osób na świecie pojawiają się doniesienia dotyczące nowych teorii i dowodów. Niezmiennie cieszy zatem fakt dynamicznego rozwoju nowych kierunków w dziedzinach, w których pokłada się ogromne nadzieje z punktu widzenia potencjalnej przydatności klinicznej. Bez wątpienia właśnie taką dziedziną nauki jest metabolomika. Jest to obszar nauki skupiający się na analizie związków drobnocząsteczkowych wykrywanych w różnorodnym materiale pochodzenia biologicznego, będących głównie produktami przemiany materii tworzącymi tzw. „metabolom". Szczególną grupą badaną są pacjentki ciężarne, u których poszukuje się różnego rodzaju markerów mogących sugerować potencjalne powikłania przebiegu ciąży, ale także chorób matki lub płodu. Trisomia 21 pary chromosomów jest najczęściej występującą u ludzi aberracją chromosomową. Zespół Downa

charakteryzuje się nie tylko występowaniem anatomicznych wad wrodzonych, ale także wiąże się z różnego stopnia upośledzeniem intelektualnym. Współczesna wiedza medyczna pozwala na przeprowadzenie badań przesiewowych o bardzo wysokim współczynniku wykrywalności oraz bardzo niskim odsetku wyników fałszywie dodatnich. Niemniej jednak, jak dotąd jedynym sposobem na stuprocentowe potwierdzenie aberracji chromosomowej u płodu jest pobranie materiału biologicznego pochodzenia płodowego poprzez przeprowadzenie prenatalnej diagnostyki inwazyjnej. Dlatego też każda próba poszukiwania dodatkowych nieinwazyjnych markerów wad genetycznych lub zwiększenia skuteczności testów przesiewowych ma nie tylko ważny aspekt naukowy, ale także niezaprzeczalny istotny aspekt kliniczny. Praca doktorska mgr Ewy Paszkowskiej: „Wykorzystanie metabolomiki w badaniach prenatalnych płodowego zespołu Downa" jest wartościową próbą wykorzystania metabolomiki do poszukiwania nowych parametrów w diagnostyce aneuploidii u płodu. Nie bez znaczenia ma także fakt, że promotorem niniejszej pracy doktorskiej jest dr hab. n. med. Monika Zbucka – Krętowska, która wiele lat swojej pracy naukowej poświęciła metodom „omicznym" w diagnostyce prenatalnej i czuwała nad najwyższym poziomem naukowym ocenianej Dysertacji.

Doktorantka wyodrębniła dwa jasno sformułowane cele Dysertacji:

- Uzyskanie profilu metabolitów różnicującego krew obwodową oraz płyn owodniowy kobiet będących w ciąży z płodem z zespołem Downa od ciężarnych z prawidłowym kariotypem płodu.

- Ocena potencjału diagnostycznego profilu metabolitów z obwodowej krwi matki w prenatalnej diagnostyce zespołu Downa.

Rozprawa doktorska mgr Ewy Paszkowskiej ma formę spójnego tematycznie cyklu trzech artykułów (dwie prace oryginalne oraz jedna praca poglądowa). Należy podkreślić, że we wszystkich publikacjach doktorantka jest pierwszym autorem. Łączna punktacja publikacji włączonych do rozprawy doktorskiej (współczynnik oddziaływania Impact Factor) to 6.629

oraz 105 punktów Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Należy zaznaczyć, że każda z prac została poddana krytycznej ocenie recenzentów przed publikacją w czasopismach naukowych, co dodatkowo potwierdza wysoką wartość poznawczą prezentowanych wyników.

Rozprawa doktorska mgr Ewy Paszkowskiej liczy 90 stron i ma układ klasyczny dla prac doktorskich w formie cyklu publikacji. Składa się ze: spisu treści, wykazu publikacji składających się na Dysertację, wstępu teoretycznego do omawianego zagadania, celów pracy, omówienia publikacji wchodzących w skład rozprawy, kopii publikacji, oświadczeń współautorów, streszczenia w języku polskim i angielskim oraz piśmiennictwa.

Uzyskane wyniki oraz dyskusja zostały zawarte w przykładnie napisanych publikacjach, które składają się na rozprawę doktorską mgr Ewy Paszkowskiej. Pierwsza z prac: *„Untargeted metabolomics: an overview of its usefulness and future potential in prenatal diagnosis"* jest pracą poglądową i stanowi bardzo wyczerpujący wstęp teoretyczny do podjętego przez Doktorantkę tematu. W manuskrypcie Doktorantka wykorzystała artykuły medyczne opublikowane do dnia 30 kwietnia 2018 roku. Łącznie przegląd literatury obejmuje wyselekcjonowane 23 publikacje naukowe prezentujące badania dotyczące tematyki wykorzystania metabolomiki w badaniach prenatalnych. W publikacji mgr Ewa Paszkowska bardzo szczegółowo i w sposób usystematyzowany ocenia w jakim stopniu niecelowana metabolomika była do tej pory wykorzystana do badania wybranych patologii ciąży. Doktorantka zebrała sześć prac poświęconych aberracjom chromosomowym płodu, dziewięć poruszających tematykę porodu przedwczesnego, po dwie prace dotyczące zapalenia błon płodowych, wady cewy nerwowej i niskiej masy urodzeniowej oraz po jednej pracy skupionej wokół zagadnień dotyczących wrodzonych wad serca płodu oraz rozszczepu kręgosłupa. Przegląd literatury wykazał, że w badaniach z wykorzystaniem technik metabolomicznych u kobiet ciężarnych z najczęściej występującymi aberracjami chromosomowych u płodu (trisomia 21, 18 i 13) skupiano się przede wszystkim na obserwacji zmian albo we krwi, albo w moczu matki. Najczęstsze różnice dotyczyły zmian stężenia kwasów 2-

hydroksybutanowego, 3-hydroksybutanowego i metylohistydyny, które wiązano głównie z zaburzeniami rozwoju układu nerwowego oraz wzrostem stresu oksydacyjnego. Przeprowadzony przegląd literatury wykazał także, że liczba prac, które oceniają różnice stężeń metabolitów jednocześnie w płynie owodniowym i surowicy pomiędzy kobietami w fizjologicznej ciąży oraz w ciąży z zespołem Downa u płodu jest znacząco ograniczona. Jest to bardzo ważna informacja, która potwierdza unikalny charakter przeprowadzonych przez Doktorantkę badań.

Dwie kolejne prace z cyklu stanowiącego Dysertację to: „*Maternal plasma metabolic fingerprint indicative for fetal Down syndrome*" oraz „*Amniotic fluid metabolic fingerprinting indicated metabolites which may play a role in the pathogenesis of foetal Down syndrome – a preliminary report*". Doktorantka przeanalizowała osocze od 12 oraz płyn owodniowy od 13 pacjentek z zespołem Downa u płodu oraz porównała swoje wyniki do grup kontrolnych. W wyniku przeprowadzonych badań mgr Ewa Paszkowska wyodrębniła listę metabolitów z płynu owodniowego i osocza krwi obwodowej różnicujących profile metaboliczne kobiet ciężarnych w zależności od kariotypu płodu. Dodatkowo w celu oceny potencjału diagnostycznego metabolitów osocza Doktorantka przeprowadziła również analizę krzywych ROC uzyskując najlepsze wyniki dla piperyny oraz kombinacji amidu kwasu linolowego i piperyny. Uzyskane wyniki potwierdzające między innymi istotnie mniejsze stężenie związków z grupy acylokarnityn zarówno w płynie owodniowym (heksanoilokarnityna), jak i w osoczu matki (butyryl-L-karnityna) mogą sugerować etiologię częściej występujących u osób z zespołem Downa choroby Alzheimera oraz cukrzycy typu 2. Dodatkowo Doktorantka sugeruje na podstawie przeprowadzonej przez siebie analizy i potwierdzonej obecności siarczanu p-krezolu w płynie owodniowym, że teoria sterylności płynu owodniowego wymaga dalszych badań i potwierdzenia. Wniosek ten jest zgodny z wynikami analiz innych badaczy oceniających środowisko wewnątrzmaciczne, w którym rozwija się płód.

W wyniku przeprowadzonych badań mgr Ewa Paszkowska sformułowała wniosek, że metabolom płynu owodniowego kobiet ciężarnych istotnie różni się składem w zależności od kariotypu płodu. Należy tym samym podkreślić, że uzyskane wyniki dostarczyły odpowiedzi na postawione przez Doktorantkę cele szczegółowe Dysertacji.

Rozprawa napisana jest jasno, pod względem redakcyjnym nie budzi zastrzeżeń. Niemniej jednak z obowiązku recenzenta pragnę zwrócić uwagę na stosowaną przez Doktorantkę nomenklaturę: w literaturze stosuje się nazwę „przezierność karku", a nie „przezierność karkowa". Za niefortunne uważam także sformułowanie „niemożliwe uwidocznienie prawidłowej osyfikacji kości nosowej", które ma dotyczyć płodów z zespołem Downa. Pragnę podkreślić, że brak kości nosowej (hypoplazja kości nosowej) oceniana w badaniu USG między 11-13 tygodniem ciąży stanowi tak zwany marker dodatkowy i nie świadczy jednoznacznie o zespole Downa. Jest to marker, który jedynie poprawia wskaźnik wykrywalności (DR – detection rate) testu złożonego. Według danych literaturowych kość nosowa jest nieobecna u około 60% przypadków płodów z trisomią 21, u 50% płodów z trisomią 18 oraz u 30% płodów z trisomią 13. Należy zatem podkreślić, że pewien odsetek prawidłowych genetycznie płodów może mieć stwierdzoną hypoplazję kości nosowej w badaniu USG 1 trymestru.

Za niefortunne sformułowanie uważam także zdanie „ilość frakcji płodowego DNA w krwi matki szacowana jest na około 4%", ponieważ średnie stężenie frakcji płodowego wolnego DNA (cffDNA) w surowicy matki wynosi około 10% - także według cytowanej przez Doktorantkę pracy autorstwa Ashoor et al. (Ultrasound Obstet Gynecol, 2013) zakres stężenia cffDNA w surowicy matki raportowany był w granicach między 7.8–13.0%. Wspomniana przez Doktorantkę wartość 4% to uznana przez wielu badaczy dolna granica stężenia frakcji płodowej wolnego DNA do uzyskania wiarygodnego wyniku badania w teście z wolnym płodowym DNA. Nie mogę także zgodzić się ze stwierdzeniem, że testy z cffDNA można stosować wyłącznie w ciążach pojedynczych. Testy z cffDNA zostały zweryfikowane w wielu

różnych grupach pacjentek i można je wykonywać także w ciążach bliźniaczych i to zarówno jedno i dwukosmówkowych.

Uwagę recenzenta zwrócił również sposób analizy danych z niecelowanych badań metabolomicznych opartych na spektrometrii mas. Uważam, że dodatkowego wyjaśnienia wymaga opis zastosowanego algorytmu umożliwiającego zastąpienie problematycznych „pustych pól". Należy pamiętać także, aby w opisie wyników mówić o „stężeniu" danej substancji, a nie o jej poziomie.

Pragnę nadmienić także, że w manuskryptach Doktorantka cytuje ryzyko poronienia związane z wykonaniem procedurami inwazyjnymi rzędu 0,5 - 3%. Dostępne są jednak bardziej aktualne publikacje, które wykazały znacznie mniejsze ryzyko związane z diagnostyką inwazyjną (Beta, J., W. Zhang, S. Geris, V. Kostiv, and R. Akolekar. "Procedure-Related Risk of Miscarriage Following Chorionic Villus Sampling and Amniocentesis." Ultrasound Obstet Gynecol 54, no. 4 (Oct 2019): 452-57 oraz Salomon, L. J., A. Sotiriadis, C. B. Wulff, A. Odibo, and R. Akolekar. "Risk of Miscarriage Following Amniocentesis or Chorionic Villus Sampling: Systematic Review of Literature and Updated Meta-Analysis." Ultrasound Obstet Gynecol 54, no. 4 (Oct 2019): 442-51.) . Należy także podkreślić, że poza opisywaną przez Doktorantkę amniopunkcją istnieje możliwość wykonania biopsji kosmówki w ciążach przed 15. tygodniem oraz kordocentezy po 18. tygodniu ciąży. Dlatego też obecnie, ze względu na większe ryzyko powikłań nie stosuje się wspomnianych przez Doktorantkę tzw. „amniopunkcji wczesnych" pomiędzy 11 – 14 tygodniem ciąży. W tym czasie preferowanym zabiegiem jest zdecydowanie przezbrzuszna biopsja trofoblastu (CVS).

Należy także zaznaczyć stosunkowo małą liczebność grup badanych, co potencjalnie może wpływać na otrzymane wyniki. Jednak liczebność badanej grupy nie odbiega od grup w innych badaniach o podobnej tematyce i z wykorzystaniem podobnego warsztatu badawczego.

Pragnę podkreślić, że wymienione przez recenzenta uwagi nie umniejszają wartości merytorycznej Dysertacji. Przed ostateczną oceną przedstawionej mi do recenzji Dysertacji, chciałbym zwrócić uwagę na całokształt dorobku naukowego Doktorantki - jest autorką lub współautorką wielu prac naukowych o łącznej liczbie współczynnika oddziaływania ponad 51 oraz 915 punktów MNiSW. Serdecznie gratuluję Doktorantce i życzę dalszych sukcesów.

Rozprawa doktorska spełnia wszystkie warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14.03.2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 z późn.zm.) oraz art. 179 ust.1 z dnia 03.07.2018 Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669 z późn.zm.). Dlatego też, biorąc pod uwagę wysoką wartość merytoryczną rozprawy doktorskiej mgr Ewy Paszkowskiej wnoszę do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie mgr Ewy Paszkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Przemysław Kosiński