

KLINIKA PERINATOLOGII,  
I KATEDRA GINEKOLOGII I POŁOŻNICTWA,  
UNIWERSYTETU MEDYCZNEGO W ŁODZI



**Kierownik Kliniki: prof. dr hab. med. Jarosław Kalinka**

94-029 Łódź, ul. Wileńska 37, tel/fax (42) 680 46 24,

e-mail: jaroslaw.kalinka@umed.lodz.pl

---

Łódź, dnia 11 lutego 2024r.

Recenzja pracy doktorskiej lek. Mateusza Kunysza pt.: *"Ocena wybranych markerów epigenetycznych u pacjentek w ciąży powikłanej cukrzycą ciążową"*.

Hiperglikemia jest najczęstszym powikłaniem metabolicznym występującym w ciąży, co czyni ją wyjątkowo istotnym tematem we współczesnym położnictwie. Obecnie odnotowuje się wzrost częstości występowania zarówno cukrzycy ciążowej (ang. Gestational Diabetes Mellitus, GDM), jak i przedciążowej (ang. Pregestational Diabetes Mellitus, GDM), głównie typu 2. Za wzrost ten odpowiedzialna jest między innymi obserwowana obecnie wśród młodych kobiet „epidemia” nadwagi i otyłości, późniejsze macierzyństwo, styl życia, a także liczne czynniki środowiskowe.

Hiperglikemia związana jest z wieloma powikłaniami występującymi w ciąży, w okresie okołoporodowym oraz po porodzie. GDM zwiększa u ciężarnej ryzyko stanu przedrzucawkowego, wielowodzia, makrosomii płodu mogącej prowadzić do porodu zabiegowego, uszkodzenia kanału rodniego, dystocji barkowej z jej potencjalnie negatywnymi konsekwencjami, a nawet do zgonu okołoporodowego noworodka.

Kobiety z hiperglikemią w ciąży narażone są na siedmiokrotnie większe ryzyko późniejszego rozwoju cukrzycy (głównie typu 2). Zwiększone jest również ryzyko zespołu metabolicznego, chorób układu krążenia, nerek, wątroby i siatkówki. Natomiast u dzieci matek z GDM obserwuje się zwiększone ryzyko wystąpienia hipoglikemii we wczesnym okresie po porodzie, hiperbilirubinemii wymagającej fototerapii, a w dorosłym życiu cukrzycy typu 2, otyłości i chorób sercowo-naczyniowych. Istnieją również doniesienia sugerujące związek między GDM zwiększonym ryzykiem wystąpienia zaburzeń ze spektrum autyzmu u dzieci i zespołu nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi (ang. attention deficit hyperactivity disorder, ADHD).

Dyskusje na temat sposobu diagnostyki hiperglikemii w ciąży trwają od lat 60. XX wieku. Obecne strategie diagnostyczne obejmują powszechne badania przesiewowe u każdej ciężarnej (FIGO, SOGC i ACOG) oraz badania wybiórcze - uzależnione od czynników ryzyka GDM (NICE). Rekomendacje dotyczące dawki glukozy oraz liczby pomiarów stężeń glukozy są nieco odmienne w zaleceniach różnych towarzystw naukowych. Przykładem mogą być tu zalecenia ACOG rekomendujące wykonanie testu przesiewowego z wykorzystaniem 50g glukozy i dopiero w przypadku nieprawidłowego wyniku - testu obciążenia 100g glukozy z czterokrotnym pomiarem stężenia glukozy. Większość wytycznych europejskich, w tym PTD i PTGiP zaleca natomiast wykonanie testu obciążenia 75 g glukozy i pomiar stężeń na czczo, po godzinie oraz po dwóch godzinach. Powyższy test wykonywany powinien być u kobiet z grup ryzyka już w I trymestrze ciąży (w przypadku prawidłowego wyniku powtarzany na dalszym etapie ciąży), natomiast u pozostałych ciężarnych między 24-28 tc. Nie może umknąć naszej uwadze, że objęcie badaniami całej populacji ciężarnych kobiet jest kosztowne oraz spotyka się niejednokrotnie z oporem ze strony kobiet, m.in. ze względu na dyskomfort związany z licznymi pobraniami krwi. W związku z powyższym stale



poszukiwane są nowe metody diagnostyczne, a także bardziej dokładne i użyteczne wskaźniki predykcyjne i prognostyczne u pacjentek ciężarnych z cukrzycą.

Tym samym wybór tematu pracy doktorskiej lek. Mateusza Kunysza wydaje się jak najbardziej uzasadniony, a uzyskane wyniki mogą przyczynić się do poszerzenia wiedzy dotyczącej innych, nowych metod diagnostycznymi a może i prognostycznych wystąpienia hiperglikemii w ciąży.

Przestawiona mi do oceny praca ma układ typowy dla rozpraw doktorskich. Z obowiązku recenzenta podaję, że praca liczy 106 stron, w tym 17 strony stanowią wstęp i przegląd piśmiennictwa, a 3 strony to opis materiału i metod badawczych. 45 stron zajmuje opis uzyskanych wyników, 11 stron to dyskusja i wnioski. W pracy zawarte zostało streszczenie polskie i angielskie. Zestawiono 132 pozycji piśmiennictwa, w tym większość to prace opublikowane po roku 2015. Opis wyników uzupełniony jest 8 tabelami i 53 rycinami.

We Wstępie, w sposób rzeczowy, w oparciu o dobrze dobrane piśmiennictwo, Doktorant przedstawia aktualną wiedzę dotyczącą m.in. rozpoznania, klasyfikacji, epidemiologii, czynników ryzyka, etiopatogenezy, powikłań oraz leczenia cukrzycy rozpoznanej w ciąży. W dalszej części Wstępu znajduje się opis roli i znaczenia epigenetyki w mechanizmach powstawania i regulacji cukrzycy. Doktorant szczegółowo omawia temat miRNA, czyli niekodujących cząsteczek RNA, z analizą mechanizmu powstania, regulacji, a także funkcji i transportu miRNA. Dalej opisany został prawdopodobny związek miR-16-5p z insulinoopornością, rola miR-222-3p w procesie zapalnym i oporności na insulinę wywołaną przez estrogeny oraz związek miR-21-5p z działaniem i wydzielaniem insuliny.



Używane w tekście przez Doktoranta zwroty oraz sensowy podział na określone podrozdziały pozwala czytelnikowi pojąć funkcję poszczególnych rodzajów miRN oraz zrozumieć zasadność wyboru konkretnych cząsteczek RNA poddanych analizie w dalszej części pracy doktorskiej.

Przedstawiony przegląd piśmiennictwa świadczy o dużej znajomości przez Doktoranta problematyki cukrzycy rozpoznanej w ciąży, epigenetycznych aspektów insulinooporności oraz współczesnych badań analizujących mechanizmy regulacyjne w cukrzycy ciążowej.

Moje uwagi do tego fragmentu pracy doktorskiej to:

1. Strona 8: FIGO dzieli ciężarne chore na: cukrzycę **rozpoznaną** w ciąży i cukrzycę ciążową a nie na cukrzycę w ciąży i cukrzycę ciążową
2. Tabela 2: rozpoznanie cukrzycy ciążowej występuje przy wartościach powyżej podanych w tabeli a nie poniżej
3. Strona 13; co to znaczy, że „poziom glukozy we krwi płodu jest adekwatny do poziomu glukozy u matki, lecz nieco niższy”?
4. Strona 14: o jakie substancje chodzi, które wg Autora zakłócają równowagę hormonalną i zwiększają ryzyko wystąpienia GDM?
5. Co Autor rozumie pod pojęciem: „zaburzenia w równowadze angiogenezy” lub że „płodowe powikłania zależą od czasu ekspozycji” – strona 15.
6. Na stronie 21 Doktorant stwierdza, że: „istnieje zainteresowanie czy miRNA są biomarkerami dla nieznanymi czynników etiologicznych” – zdanie to wg mnie nie jest do końca zrozumiałe. Podobnie budzi moją wątpliwość stwierdzenie, że ” miRNA to idealni kandydaci na biomarkery, ponieważ technologie stosowane do ich wykrywania są specyficzne i czułe” – to chyba trochę za mało, żeby być idealnym biomarkerem?



7. Co Autor ma na myśli pisząc, że „mi RNA-222-3p ...jest silnie konserwatywny u kręgowców”? – strona 23

Celem głównym Doktoranta było próba określenia związku między wybranymi czynnikami epigenetycznymi (miRNA) a występowaniem cukrzycy ciążowej oraz między analizowanymi czynnikami epigenetycznymi a wybranymi parametrami takimi jak m.in.; stężenie glukozy, insuliny, wskaźnikiem Homa czy BMI.

Dodatkowo Autor przedstawił ambitną hipotezę badawczą, którą było próba odpowiedzi na pytania czy stężenie wybranych miRNA może być przydatne w diagnostyce i monitorowaniu przebiegu cukrzycy. Tutaj mam jednak wątpliwość czy projekt badania, jego zakres, badana populacja i użyte metody dają szansę uzyskania odpowiedzi na tak, jeszcze raz podkreślę, ambitne cele.

W rozdziale Materiał i Metody Doktorant przedstawił populację badanych kobiet oraz użyte metody badawcze. Badania prowadzono w Pododdziale Perinatologii Kliniki Ginekologii, Położnictwa i Perinatologii Klinicznego Szpitala Wojewódzkiego nr 2 w Rzeszowie. Do badania zakwalifikowano łącznie 72 kobiety wyodrębniając dwie grupy badane: pierwsza to 42 pacjentki z cukrzycą ciążową; druga grupa to 30 ciężarnych bez rozpoznanej cukrzycy ciążowej. Badanie zostało zatwierdzone przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Rzeszowskiego (nr 4/02/2020). W przedstawionej charakterystyce badanej populacji brak jednak precyzyjnego opisu badanych grup kobiet. Brak m.in. informacji kiedy w czasie ciąży cukrzyca ciążowa została stwierdzona lub wykluczona. W pracy nie została zawarta informacja, czy Autor zweryfikował samodzielnie diagnozę GDM, przez samodzielną interpretację wyniku OGTT u pacjentek w grupie kontrolnej i w grupie badanej. Sugerować mogą to chociażby wyniki zawarte na rycinie 22 (str.47), gdzie pomiar stężenia glikemii na

czczo u pacjentek z grupy kontrolnej (tzn. bez cukrzycy) wynosił w kilku przypadkach  $\geq 92$  mg/dl. Brakuje także jednoznacznej definicji stanu przedrzucawkowego oraz porodu przedwczesnego (samoistny vs jatrogeny).

Materiałem do badań była krew obwodowa z żyły odłokciowej. Osocze zabezpieczono do ekstrakcji RNA. Autor szczegółowo opisuje metody stosowane do izolacji RNA z wykorzystaniem zestawu miRNA/sncRNA Isolation kits firmy Biovendor oraz metody oceny koncentracji miRNA w osoczu z użyciem zestawu firmy Biovendor. Brak jednak informacji o ocenie u badanych pacjentek takich czynników jak m.in. CRP, wskaźnik Homa czy stężenie insuliny, które to parametry pojawiają się później w części dotyczącej wyników badania. Analizując związek z określonymi parametrami morfologii krwi, np. WBC, PLT czy CRP, należało uwzględnić wykluczenie pacjentek posiadających schorzenia mogące mieć potencjalny wpływ na te wyniki – chociażby stany zapalne, PROM, HELLP etc. W tym miejscu brakuje mi także precyzyjnego opisu kryteriów włączenia i wyłączenia z badania w tym informacji o chorobach współistniejących lub stosowanym leczeniu, czyli o czynnikach mogących wpływać istotnie na otrzymane przez Doktoranta wyniki.

Do oceny istotności statystycznej uzyskanych wyników zastosowano adekwatne metody statystyczne, a obliczeń dokonano przy użyciu oprogramowania firmy Dell o nazwie Statistica.

Doktorant w dalszej części pracy doktorskiej przedstawia charakterystykę grupy badanej i kontrolnej, uwzględniając m.in. wiek, rodność, drogę porodu, liczbę porodów przedwczesnych, stanu przedrzucawkowego, czas trwania ciąży, masy urodzeniowe noworodków, BMI, przyrost masy ciała w ciąży. Dobrze byłoby ułożyć otrzymane wyniki w kolejności np. wyniki matczyne, noworodkowe i inne, co ułatwiłoby ich śledzenie w tekście.



Przy analizie czasu trwania ciąży w obu grupach brakuje mi informacji o zastosowanej częstotliwości indukcji porodu szczególnie w grupie z GDM, w której zgodnie z rekomendacjami PTGiP powinno się indukować pacjentki po ukończonym 39 tygodniu ciąży.

Następnie poddane analizie zostały stężenia glukozy, insuliny, parametry morfologii krwi oraz wskaźnik HOMA-IR. Autor stwierdza m.in., że masa urodzeniowa noworodków pacjentek z cukrzycą ciążową była istotnie statystycznie wyższa w porównaniu do noworodków matek z grupy kontrolnej. W grupie badanej stwierdzono wyższe (istotnie statystycznie) BMI oraz większy przyrost masy ciała w ciąży.

W dalszej części pracy doktorskiej Autor przedstawia wyniki dotyczące oceny ekspresji wybranych miRNA. Nie stwierdził on istotnych różnic dotyczących stężenia miR-16-5p, miR-222-3p, ani miR-21-5p między grupą badaną oraz kontrolną. Wykazał natomiast w grupie kontrolnej istotną statystycznie dodatnią zależność między występowaniem stanu przedrzucawkowego a koncentracją miR-222-3p, a w grupie pacjentek z cukrzycą dodatnią korelację między ekspresją miR-21-5p a masą ciała pacjentek przed ciążą.

Interpretację wyników oraz poszczególnych zależności ułatwiają załączone tabele, które prezentują wyniki badań. Na wielu rycinach brak jednak informacji o istotności statystycznej otrzymanych wyników.

W Dyskusji Autor szczegółowo analizuje uzyskane wyniki badań w kontekście publikowanych prac poruszających podobne zagadnienia. Następnie w sposób rzetelny podejmuje próbę uzasadnienia swoich wyników i ewentualnych rozbieżności w stosunku do innych doniesień. W tej części pracy występują drobne błędy stylistyczne w moim przekonaniu wymagające poprawy np.;



1. Strona 79 Doktorant pisze: „w badaniu ...oceniono ekspresję miR-222-3p w osoczu i stwierdzono zwiększoną ekspresję” .
2. Strona 79; „podwyższone poziomy miR-21-5p we wczesnym i środkowym okresie ciąży” – czyli kiedy?
3. Strona 79: „stwierdzono związek jedynie u kobiet z nadwagą lub były otyłe przed ciążą” -?

Dużo uwagi Doktorant poświęca aspektom technicznym swojej pracy, z jednej strony uzasadniając ich wybór, a z drugiej krytycznie ustosunkowując się do ich wad i ograniczeń. Z ostrożnością odnosi się też do interpretacji otrzymanych wyników, co godne jest zauważenia. Autor sam konkluduje, że cyt. „dokładne uwzględnienie specyficznych aspektów podczas dobierania pacjentek do badania ma kluczowe znaczenie dla osiągnięcia wiarygodnych wyników”. Z drugiej strony rodzi się pytanie czy nie można było tych ograniczeń zminimalizować na etapie planowania badania choćby przez dobór bardziej jednorodnej grupy badanej czy poprzez zastosowanie metody analizy statystycznej wyłączającej wpływ tzw. czynników zakłócających na uzyskane wyniki.

Mimo braku istotnych różnic koncentracji miR-222-3p, miR-16-5p i miR-21-5p w grupie pacjentek z rozpoznaną cukrzycą w ciąży oraz bez takiego rozpoznania, Autorowi udało się określić zależności między poszczególnymi miRNA a wybranymi parametrami klinicznymi. Doktorant wskazuje chociażby na dodatnią korelację między miR-16-5p a BMI i HOMA-IR u pacjentek z GDM. Pracę kończą 4 wnioski. Trzy pierwsze wnioski odpowiadają założonym wcześniej celom pracy. Wniosek czwarty dotyczący związku między miR-222-3p a stanem przedrzucawkowym stwierdzonym jedynie w grupie kontrolnej nie do końca jest według mnie uzasadniony i związany z tematem pracy.



Piśmiennictwo, zawiera 132 pozycje, z których większość pochodzi z renomowanych czasopism zagranicznych o wysokim wskaźniku wpływu. Piśmiennictwo zostało dobrze dobrane i właściwie zacytowane.

Praca doktorska lek. Mateusza Kunysza stanowi wyczerpujące, samodzielne rozwiązanie problemu naukowego. Dużym plusem pracy jest zwrócenie uwagi na związek wybranych czynników epigenetycznych z cukrzycą ciążową oraz wybranymi parametrami klinicznymi.. Autor dogłębnie zapoznał się z literaturą dotyczącą analizowanych zagadnień i potrafił uzasadnić wybór konkretnych ncRNA z bardzo dużej puli cząsteczek aktualnie podejrzewanych o związek z GDM.

Praca doktorska przygotowana została w sposób prawidłowy, a uwagi wymienione przeze wynikają z roli recenzenta i nie zmniejszają mojej pozytywnej oceny całości pracy.

Zakres, jakość, znaczenie oraz sposób prezentacji wykonanych badań oceniam wysoko. Rozprawa w szczególności stanowi oryginalne, samodzielne rozwiązanie problemu naukowego oraz wskazuje na ogólną wiedzę teoretyczną i praktyczną Doktoranta w tej dyscyplinie naukowej, a także umiejętność prowadzenia pracy naukowej. Doktorant rozwiązał samodzielnie problem istotny z punktu widzenia zarówno naukowego jak i klinicznego. Praca ma szereg aspektów poznawczych i stanowi podstawę do dalszych badań. Uzyskane przez Doktoranta wyniki mogą przyczynić się w przyszłości do odkrycia bardziej dokładnych i użytecznych wskaźników predykcyjnych, prognostycznych i monitorujących u pacjentek z cukrzycą ciążową.



Reasumując stwierdzam, że przedmiot prowadzonych badań, prezentacja wyników, rzeczowość dyskusji oraz uzyskane wnioski rozprawy doktorskiej lek. Mateusza Kunysza upoważniają mnie do stwierdzenia, iż przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187. Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Mam zatem zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Kolegium Nauk Medycznych Instytutu Nauk Medycznych Uniwersytetu Rzeszowskiego pozytywną recenzję pracy i prosić Wysoką Radę o dopuszczenie lek. Mateusza Kunysza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

  
KIEROWNIK  
Kliniki Perinatologii  
I Katedra Ginekologii / Położnictwa  
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi  
Prof. dr hab. n. med. Jarosław Kalinka