

Prof. dr hab. Bogusław Pawłowski
Katedra Biologii Człowieka
Uniwersytet Wrocławski

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Klaudii Jabłońskiej
pt.: ***”Zależność pomiędzy przeszłością położniczą kobiet a wybranymi markerami
odpowiedzi zapalnej”***

Praca doktorska pani mgr Magdaleny K. Jabłońskiej dotyczy zależności między wybranymi parametrami historii reprodukcyjnej kobiet charakteryzujących się względnie dużą dzietnością i trzema immunologicznymi biomarkerami stanu zdrowia kobiet będących w wieku poreprodukcyjnym. Autorka analizowała dane 381 kobiet w wieku powyżej 45 lat (średnia wieku to niemal 62 lata) zamieszkujących kilka miejscowości w Beskidzie Wyspowym, a zatem w rejonie charakteryzującym się najwyższymi wskaźnikami płodności w Polsce.

Zważywszy na cel pracy i założeniach testowanych w pracy koncepcji, a w tym wysokich kosztów reprodukcji i hipotezy starzenia się funkcji układu immunologicznego („*inflammaging*”), próba badawcza została dobrze wybrana (przynajmniej jak na polskie czy nawet europejskie warunki). Praca jest niewątpliwie oryginalna i wnosi istotny wkład do badań związanych z badaniami nad kompromisami ewolucyjnymi jakie w określonych warunkach ekologicznych może ponosić kobieta z powodu kosztów reprodukcyjnych. Warto przy tym podkreślić, że w przeciwieństwie do wielu wcześniejszych badań w których uwzględniano np. tylko liczbę dzieci albo ich płeć, autorka uwzględniła w badaniach wiele parametrów historii reprodukcyjnej kobiety. Ten ogólny pozytywny odbiór tematu i złożoności pracy, nie znaczy, że dysertacja - przynajmniej w mojej ocenie – nie ma słabych stron.

Zacznę od tytułu pracy. W mojej ocenie w tytule dysertacji zamiast „przeszłość położnicza” powinna być raczej „historia reprodukcyjna. Położnictwo zajmuje się bowiem tylko fizjologicznym okresem ciąży, porodu i porożu, tymczasem autorka bada również liczbę dzieci pod względem płci, wiek urodzenia pierwszego czy ostatniego dziecka i chociaż nie bada odstępów między urodzeniami (a szkoda, bo chociaż na mniejszym materiale, ale dało

się to zrobić), to jednak celniejszy byłby temat mówiący o historii reprodukcyjnej, a nie o „przeszłości położniczej”.

Wstęp napisany jest zrozumiale i odzwierciedla gruntowną znajomość tematyki, którą zajęła się doktorantka. Przegląd bogatej już literatury związanej z tematem pracy jest imponujący (liczba referencji sięga niemal 300). Autorka przedstawia we wstępie teoretyczne założenia swojej pracy i przytacza wiele dotychczasowych wyników badań testujących te hipotezy. W wielu przypadkach jednak wyniki nie są tak konsistentne jak można by oczekiwać przy pozytywnej empirycznej weryfikacji testowanych hipotez. Czasami bowiem (czy w niektórych populacjach) liczba potomstwa wpływa na różne parametry zdrowia czy długość trwania życia kobiety, a czasami nie. Ten brak spójności wyników sprzyja autorce bo daje poważny asumpt do tego aby podjąć następną próbę testowania ewolucyjnych hipotez o których pisze we Wstępie. Autorka postanowiła zatem zbadać czy trzy biomarkery zdrowia (CRP, interleukina – 6 (IL-6) oraz czynnik martwicy nowotworów - α (TNF- α)), świadczące m.in. o poziomie stanu zapalnego i w pewien sposób informujące o stanie zdrowia kobiety są związane z kilkoma ilościowymi parametrami historii reprodukcyjnej kobiety. Obok liczby potomstwa są to wiek rozpoczęcia i zakończenia reprodukcji czy też płeć urodzonych dzieci. W tym ostatnim przypadku autorka zakłada, zgodnie z literaturą przedmiotu, że kobiety ponoszą wyższy koszt biologiczny rodząc synów. Chociaż tę część pracy czyta się dobrze, to uważam, że niektóre wątki czy nawet podrozdziały są zbędne. Na przykład podrozdz. 9 w którym autorka pisze o roli (skracaniu) telomerów w procesie starzenia, jest w zasadzie zbędny, bo przecież w pracy nie badane są te cechy (czy inne parametry genetyczne) i potem brak też o tych kwestiach w dyskusji. Te informacje podawane we Wstępie raczej wprowadzają w błąd czytelnika, bo po ich przeczytaniu oczekuje się, że są one w jakiś sposób relewantne z badaniami podjętymi w ramach tej pracy doktorskiej. Co więcej, wstęp kończy się tym właśnie rozdziałem, co zaskakujące, bo trudno na podstawie takiego zakończenia tego rozdziału przewidzieć, co dokładnie będzie przedmiotem tej pracy. Najbardziej prawdopodobne (po takim wstępie) wydaje się, że będą w pracy analizowane wszystkie mierniki stanu zdrowia czy wieku biologicznego (w tym długość telomerów czy stres oksydacyjny), a tak nie jest. Autorka pisze we Wstępie dużo o kosztach fizjologicznych ciąży i laktacji – co oczywiście jest bardzo zasadne – ale niemal pomija problem potencjalnych stresów „wychowawczych” przeżywanych przez matkę, które mogą rosnać wraz z liczbą potomstwa i mogą wpływać na stan zdrowia i długość trwania życia kobiet. Ten aspekt mógłby być nieco szerzej poruszony również w Dyskusji. W mojej ocenie we „Wstępie” bardziej niż w „Dyskusji”, pasowałby np. wątek dotyczący porównań człowieka z innymi naczelnymi pod względem płodności czy innych aspektów reprodukcyjnych.

Generalnie rozkład pracy pod względem objętości poszczególnych jej głównych części jest stosunkowo nietypowy czy zaskakujący. Wstęp bowiem ma aż 50 stron, a pozostałe wszystkie ważne rozdziały (bez bibliografii) tylko 30 stron, a w tym kilka stron z samymi wykresami, które zawierają tylko rozkłady zmiennych i to w podziale na kategorie, które w większości przypadków (chyba tylko poza kategoriami wykształcenia) nie mają odzwierciedlenia w typie zmiennych wykorzystanych w analizach statystycznych.

W mojej ocenie hipoteza badawcza powinna znaleźć się w rozdz. „Cel pracy”, a nie w odrębnym, zbędnym rozdziale 11 („*Hipoteza badawcza*”). Pojawia się przy okazji problem z niedopracowaniem dysertacji pod względem edytorskim. Nie rozumiem dlaczego takie rozdziały jak Cel pracy, Metody, Wyniki, Dyskusja (od rozdz. 10 do 16) są podrozdziałami Wstępu? Tak bowiem wynika ze struktury całej pracy i informacji zawartej w jej spisie treści. Co więcej, w samym „Spisie treści” są dwa rozdziały pt. „Wyniki” (rozdz. 13 i 16) (choć potem w pracy, rozdz. 16 zatytułowany jest poprawnie: „Wnioski”).

Opis metodyki badań jest w mojej ocenie nieco zbyt oszczędny. W takiej pracy jak dysertacja jednak autorka powinna również opisać szczegółowo metody analityczne wykorzystane do oznaczania biomarkerów. Opisana bowiem jest tylko procedura pobierania krwi i jej przechowywania, a brak info o szczegółach analizy laboratoryjnej, dzięki której uzyskano dane dla badanych biomarkerów.

Autorka stosuje dla badanych zmiennych podział na tercyle. Nie jest to błąd, ale myślę, że warto byłoby pokusić się o sprawdzenie różnic w poziomie badanych biomarkerów między kobietami względem określonych przez immunologów (medyków) wartości granicznych. Podział tercylowy nie musi być najlepszym rozwiązaniem dla każdej badanej cechy. Na przykład wiek zakończenia reprodukcji może mieć bardzo różne uwarunkowania, a w badanej populacji tylko nieco ponad 10% kobiet zakończyło reprodukcję po 40 roku życia. Dlatego warto dokonać porównań też w zależności od pewnych biologicznych „progów wiekowych” związanych z możliwościami reprodukcyjnymi kobiet. Pokusiłbym się też o stworzenie kompleksowego miernika, który uwzględniałby standaryzowane wartości trzech badanych biomarkerów (CRP + IL-6 +TNF). Teraz bowiem część analityczna pracy jest stosunkowo uboga i czasami niezbyt przejrzyste przedstawiona w tabelach. Uważam, że w takiej pracy dyplomowej powinno się podać dokładne wartości statystyk i to nie tylko dla danego biomarkera, ale też kontrolowanych zmiennych. Brak zakresów badanych biomarkerów (są tylko histogramy, ale dla zlogarytmowanych wartości) ogranicza możliwości wglądu i sugestii ewentualnego innego podziału materiału do dodatkowych analiz statystycznych. W mojej ocenie zaskakujące są tak niskie wartości CRP dla badanych kobiet,

bo w większości badań dla tej grupy wieku, CRP jest kilkakrotnie wyższe. Z reguły CRP rośnie nie tylko z wiekiem, ale też z uwzględnianym w pracy BMI, a w badanej grupie kobiet średnie BMI jest bardzo wysokie ok. 30. Możliwe jednak iż na tak niski poziom CRP w badanej populacji wpłynęła medyczna preselekcja kobiet do badań (zakwalifikowano do badań tylko kobiety naprawdę zdrowe), a tymczasem w wielu innych pracach w których podaje się średnie wartości CRP uwzględniane mogą być kobiety bez wstępnej medycznej oceny ich stanu zdrowia. Pozostałe dwa biomarkery też są stosunkowo niskie, ale już znacząco nie odbiegają od tych wartości w innych badaniach (np. polskie dane: Wyczalkowska-Tomasik et al. 2015). Szkoda, że autorka nie odniosła się do tego problemu w dyskusji.

Prezentacja wyników nie zawsze jest czytelna (podane są w zbyt uproszczonej postaci), a w niektórych przypadkach pojawiają się błędy. Na przykład z tab. 8 (str. 72) chyba wynika, że CRP nie jest związane z wiekiem, a w opisie tych wyników powyżej tabelki autorka pisze, że wiek jest zmienną „zakłócającą” CRP. Jeśli w istocie brak tej zależności to jest to zaskakujący wynik, bo jak wcześniej już pisałem, w wielu badaniach jednak CRP rośnie z wiekiem. W podrozdz. 13.3 autorka dokonała jednoczynnikowej analizy wariancji dla wykształcenia i osobno każdego z trzech biomarkerów. Problem polega na tym, że jeśli nie kontroluje się wieku (ale też BMI) to interpretacja takiej analizy może być błędna. Na przykład jeśli kobiet z wyższym wykształceniem jest więcej w młodszej kohorcie wiekowej, to nie wykształcenie, a wiek mógł de facto wpłynąć na różnice w wartościach biomarkerów w badanych grupach wykształcenia. Tabela 10 przedstawia jedne z najważniejszych wyników tej pracy, jednak w mojej ocenie taki sposób prezentacji wyników to minimalizm, którego powinno się w pracach dyplomowych unikać. Autorka powinna pokazać jednak szczegółowe wyniki wszystkich tych regresji wielorakich. Umożliwiłoby to również wgląd w to jak czynniki zakłócające wpływają na badane cechy historii reprodukcyjnej kobiety. Zastanawiające są też identyczne wartości R^2 dla niektórych badanych biomarkerów (np. w przypadku TNF dla wieku urodzenia pierwszego i ostatniego dziecka lub też dla liczby córek i liczby synów). Mam też wątpliwości w kwestiach interpretacji wyników uzyskanych na podstawie badań w których uwzględniane w analizach BMI kobiet to BMI gdy kobieta ma już np. ponad 70 lat, a ostatnie dziecko urodziła gdy miała 33 lata. Nie twierdzę, że to błąd, ale autorka powinna poruszyć ten problem w dyskusji i wyjaśnić dlaczego można tak a nie inaczej interpretować wyniki gdy uwzględnia się cechy morfologiczne kobiety (a te z reguły zmieniają się z wiekiem) w innym okresie życia niż gdy „kształtowały się” wszystkie badane parametry historii reprodukcyjnej kobiety. Autorka pisze co prawda o niektórych wadach i zaletach swoich badań, ale dość zdawkowo porusza problem braku w badanej populacji

bezdietnych kobiet, które mogłyby stanowić niejako próbę kontrolną. Nie można bowiem wykluczyć, że uwzględnienie takiej grupy kobiet ujawniłoby jednak istnienie zdrowotnych kosztów (badanych przy pomocy trzech biomarkerów) ponoszonych przez kobiety z powodów reprodukcyjnych.

Wbrew hipotezie postawionej w pracy, autorka nie wykazała żadnych związków (również przy kontroli zmiennych zakłócających) między badanymi biomarkerami a parametrami historii reprodukcyjnej kobiet. Dyskusja jest stosunkowo krótka, ale względnie spójna. Mając rozległą wiedzę na temat, którym się zajmowała doktorantka oraz niejednoznaczne wyniki wcześniejszych badań, autorka nie ma problemu z wyjaśnieniem swoich negatywnych wyników. Słusznie zwraca uwagę na warunki ekologiczne i względny dobrostan badanej populacji, które mogły uniemożliwić pozytywną weryfikację postawionej ewolucyjnej hipotezy, którą dobrze byłoby jednak przetestować w populacjach żyjących w warunkach ekologicznych daleko bliższych tym warunkom w naszej ewolucyjnej przeszłości. Autorka również zdaje sobie sprawę z różnych ograniczeń swojej pracy, np. zwraca uwagę na brak informacji o długości trwania laktacji, która jest ważnym kosztem energetycznym dla kobiety, a która to zmienna nie jest w pracy analizowana. W mojej ocenie, autorka mogła spróbować położyć większy nacisk w Dyskusji na polemikę z tymi pracami (a przecież o wielu pisze we Wstępie), w których wykazano wynik odmienny (niekoniecznie na tych samych biomarkerach) od tego jaki uzyskała w dysertacji doktorantka. Na przykład warto było przedyskutować różnice między wynikami własnymi a badaniami fińskimi (ref. 11) (w których uzyskano inny wynik). Bo jeśli np. kobiety w próbie fińskiej rodziły ostatnie dziecko średnio w 40-43 roku życia, a w polskiej w 33 roku życia, to może to wyjaśniać odmienne wyniki w tych dwóch badaniach. Byłoby to też wsparcie dla sugestii autorki dysertacji, że po urodzeniu ostatniego dziecka kobiety przez nią badane miały dużo czasu na biologiczną regenerację i stąd brak związku między ich historią reprodukcyjną i badanymi parametrami reprodukcyjnymi. Podkreślam ten aspekt, bo w takich pracach autorzy dość często unikają rzeczowej polemiki czy konfrontacji swoich wyników z wynikami innych autorów. Takie rzeczowe drażnienie przyczyn różnic między wynikami własnymi i wynikami innych autorów jest bardzo ważne, bo pozwala ocenić wnikliwość autora dysertacji i rygoryzm metodyczny, a tym samym ocenić metodyczną wiarygodność badań będących przedmiotem dysertacji w porównaniu z innymi, wcześniej prowadzonymi badaniami. Dyskusja niewątpliwie pozostawia niedosyt, a powyżej opisałem kilka wybranych wątków, które w mojej ocenie powinny się w tej części pracy znaleźć.

W pracy jest kilka drobniejszych błędów, niejasności czy terminologicznych niezgrabności. Na przykład na stronie 19 pojawiają się sprzeczne informacje. Autorka

najpierw pisze (za ref. 52), że ryzyko zgonu matki z 1 dzieckiem jest wyższe, a w następnym zdaniu, że jest niższe. Na stronie 24 autorka pisze o „niższej długości ciała w momencie osiągnięcia dorosłego wieku”. To jednak bardzo naukowo niezgrabne określenie na wysokość ciała. W mojej ocenie autorka niepotrzebnie podaje w tekście wyniki statystyk, które są zawarte w tabelach (np. str. 64 tab. 5) lub powtarza w tekście wartości liczbowe lub procentowe przedstawione na rycinie (np. str. 65 ryc. 2, a wartości procentowe można było umieścić na słupkach histogramu). Na stronie 68 jest błąd pod ryciną 8, gdzie jest informacja o 124 kobietach w przedziale wieku 50-69 (chyba było ich 224). Na str. 83 autorka stosuje raczej nieużywaną polską nazwę gatunkową dla *Papio cynocephalus* (znacznie częściej niż „żółty” używa się „masajski” lub „zielony”).

Recenzja zawiera różne zastrzeżenia czy wątpliwości, bo takie, jak miemam jest zadanie recenzenta, który powinien zwracać uwagę na te aspekty pracy, które mają niedociągnięcia lub które można zweryfikować przy przygotowywaniu takiej dysertacji do publikacji. Generalnie jednak uważam, że całościowo praca ma zasadniczo więcej pozytywnych walorów i kwalifikuje się jako praca, która spełnia warunki jakie powinna spełniać akceptowalna dysertacja. Podkreślę raz jeszcze, że pomimo krytycznych uwag, w mojej ocenie dysertacja jest oryginalna pod względem koncepcji samych badań, jest solidnie teoretycznie ugruntowana i świadczy o wnikliwym zapoznaniu się z tematyką, której podjęła się doktorantka. Wyniki uzyskane przez doktorantkę to cenny wkład do badań nad weryfikacją ewolucyjnych hipotez związanych z alokacją energii i kosztami reprodukcji u człowieka.

Podsumowując, stwierdzam, że recenzowana przeze mnie praca pt.: *”Zależność pomiędzy przeszłością położniczą kobiet a wybranymi markerami odpowiedzi zapalnej”* spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim i wnoszę o dopuszczenie mgr Magdaleny Klaudii Jabłońskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

prof. dr hab. Bogusław Pawłowski