Lublin, 10.08.2019

Dr hab.n. med. Marek Sikorski, prof. UJK
Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach
Wydział Lekarski i Nauk o Zdrowiu
Zakład Perinatologii
i Pielęgniarstwa Ginekologiczno-Położniczego

Wysoka Rada
Wydziału Lekarskiego
Collegium Medicum
Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

Recenzja pracy doktorskiej
lekarz **Joanny Figuły**
Stężenie osteopontyny w surowicy krwi pacjentek z klinicznie i histologicznie potwierdzoną endometriozą

Zagadnienie patogenezy endometriozy, któremu powięciła swoje badania Doktorantka, jest od wielu dziesięcioleci jednym z mniej poznanych stanów chorobowych spotykanych w ginekologii. Powstawanie ognisk aktywnie proliferującej tkanki endometrioidalnej w ektopowej, głównie otrzewnowej lokalizacji tłumaczone jest współczesnie wieloma teoriami, co prawda wzajemnie się uzupełniającymi, lecz nie dającymi możliwości zrekonstruowania jednolitego mechanizmu zarówno genezy obcosiedliskowych wszczepów endometrium ani ich agresywnej natury biologicznej. Dociekania w tym zakresie powinny znajdować się w głównym nurcie badań klinicznych, a przede wszystkim molekularnych i genetycznych, ze względu na wysoką częstość wystepowania klinicznie jawnej endometriozy, osiagającej u kobiet w wieku prokreacyjnym wartość około 10%, oraz wielokierunkowe poważne następstwa tego stanu - od radykalnego obniżenia jakości życia w następstwie silnych dolegliwości bolowych do znaczącego spadku płodności w mechanizmie anatomicznego zablokowania drożności jajowodów i immunologicznie warunkowanych zaburzeń implantacji.

Poza trudnościami w okresleniu mechanizmów wiodących do powstania ektopii endometrialnych, klinicznie napotykamy przeszkody w jednoznacznym rozpoznaniu endometriozy, które praktycznie możliwe jest jedynie w trakcie inwazyjnego zabiegu laparoskopowego. Niezwykle pożądanym jest więc biologiczny/ biochemiczny marker endometriozy, na tyle czuły i swoisty by proces diagnozowania uprościć. Dotychczas stosowane markery (głównie osoczowy poziom antygenu CA-125) nie spełniają tych wymogów. Wybór osteopontyny - ufosforylowanej glikoproteiny pierwotnie wyizolowanej z tkanki kostnej - jako białka związanego z rozwojem endometriozy, jest w pełni uzasadniony. Takiego wyboru dokonała Doktorantka, kierując się literaturowymi przeslankami wskazującymi na rolę jaką to białko pełni w procesach zapalnych, angiogenezie, adhezji komórkowej oraz apoptozie, a więc tymi, które w sposób udokumentowany wiążą się z rozwojem endometriozy.

Za cel swoich badań Autorka przyjęła zbadanie różnic w zakresie ekspresji genu osteopontyny pomiędzy tkanką prawidłową i implantami endometriotycznymi oraz różnic w osoczowym stężeniu produktu tego genu pomiędzy kobietami z endometriozą i bez niej. Jakkolwiek sformułowanie celu głównego jak i kroków szczegółowych jest czytelne, niezupełnie właściwe wydaje się być zawarte w nim określenie „związek przyczynowy" pomiędzy ekspresją badanego genu a rozwojem endometriozy - badanie zaprojektowane przez Doktorantkę nie daje bowiem możliwości ustalenia przyczyny, a jedynie związku. Wydaje się także niewłaściwym

użycie dwukrotnie sformułowania „potwierdzenie" w odniesieniu do zmian ekspresji genu osteopontyny oraz w odniesieniu do zmian stężeń surowiczych osteopontyny. Takie sformulowanie zakłada *ante hoc* istnienie różnic, które mają być właśnie poddane obiektywnemu badaniu, właściwsze byłoby więc użycie słowa „określenie" lub „zbadanie".

Badanie stężenia produktu genu osteopontyny przeprowadzono metodą immunoenzymatyczną ELISA, dysponującą deklarowaną 100% swoistością analityczną i bardzo wysoką czułością analityczną (0,024 ng/mL), w surowicy krwi 20 pacjentek w wieku prokreacyjnym z endometriozą oraz 20 pacjentek bez endometriozy. Wiek pacjentek z grupy badanej (bez endometriozy) nie został jednak okreslony jednoznacznie - można jedynie zakładać, że nie wystąpiły istotne różnice w tym zakresie, choć Autorka tego nie precyzuje. W wyniku porównania średnich stężeń osteopontyny pomiędzy grupą badaną i kontrolną wykazano statystycznie istotnie wyższe stężenie osoczowe badanego białka w grupie kobiet z endometriozą (p=0,0077), choć moc statystyczna badania była niewystarczająca by wykazać istotność różnic stężeń osteopontyny w zależności od klinicznego stopnia zaawansowania zmian. Zasadniczo jest to główny wniosek odzwierciedlający tytuł prezentowanej pracy. Zwraca jednak uwagę niepełna informacja o zawartości pracy jaka w tym tytule jest ujęta: poza określeniem stężenia osteopontyny praca zawiera wszakże rozległe badania nad ekspresją genów, których opis zasadniczo dominuje zarówno w metodyce, jak i w omówieniu wyników a także w dyskusji. Trzy spośród czterech wniosków dotyczą tych właśnie zagadnień, przez co zasadne wydaje się takie zredagowanie tytułu pracy, by informował także o badaniach genetycznych przeprowadzonych w toku jej realizacji. Drobną, ale istotną uwagą jest brak jednostek stężeń osteopontyny w rozdziale omawiającym wyniki badania immunoenzymatycznego.

Uzyskany wynik jednoznacznie przemawia za bardzo wysoką czułością osoczowego stężenia osteopontyny jako markera endometriozy, nie znana jest jednak jego swoistość kliniczna, co nie dziwi biorąc pod uwagę konstrukcję badania Doktorantki oraz niską liczebność badanych - nie było to zresztą celem opracowania.

Dociekając podłoża podwyższonego stężenia osteopontyny w surowicy kobiet z endometriozą Doktorantka przeprowadza analizę ekspresji genów w tkankach ognisk endometrialnych oraz tkankach zdrowej otrzewnej pobranych w trakcie laparoskopii od 4 pacjentek z endometriozą, wykorzystując zaawansowaną technikę ludzkiej oligonukleotydowej mikromacierzy, którą adekwatnie opisuje. Stosując restrukcyjne kryteria znamienności statystycznej w odniesieniu do zmiany ekspresji genów wykazała, że w tkankach ognisk endometriozy w porównaniu do tkanki zdrowej zmieniona ekspresja dotyczy 214 genów, przy czym w większości ma charakter nadekspresji. Wśród ujawnionych genów z nadekspresją znajduje się gen osteopontyny SPP1. Analizując szlaki metaboliczne związane z genami, których ekspresja była zmieniona w ogniskach endometriozy, Autorka przy użycu aplikacji GeneSpring identyfikuje 8 takich szlaków, w tym szlak sygnałowy osteopontyny, ale także m. in. szlak receptora witaminy D - który następnie dość dokładnie omawia w dyskusji, szlak kaskady receptorów Toll-like i połączeń synaps pęcherzykowych. Wykorzystując w kolejnym etapie badań metodę ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (RT-PCR) Doktorantka wykazuje wysoki przyrost ilości transkryptu genu osteopontyny w ogniskach endometriozy, ponad 30. krotnie przewyższający ilość transkryptów tego genu w zdrowej otrzewnej. Uzyskany wynik nie dziwi, biorąc pod uwagę radykalnie wyższe stężenie finalnego produktu genu osteopontyny oznaczonego klasyczną metodą ELISA. Cztery wnioski jakie wysnuwa Autorka po przeprowadzonych badaniach wynikają z nich bezpośrednio i mają charakter syntetycznych i logicznych podsumowań.

Oceniając projekt badania, jego założenia i technikę przeprowadzenia należy stwierdzić, że badania zostały zaplanowane według reguł kierujących dociekaniami naukowymi, grupy badana i kontrolna - zarówno w odniesieniu do badań białka osteopontyny jak i ekspresji genu kodującego to białko - dobrane są adekwatnie i

umożliwiają poprawne wnioskowanie zaś zastosowane techniki laboratoryjne są nowoczesnymi narzędziami współczesnej biologii molekularnej. Postawiony cel pracy został jednoznacznie zrealizowany.

Przedłożona do oceny dysertacja zawarta jest na 60 stronach maszynopisu i ma typowy dla takich opracowań układ. We wstępie zawartym na 13 stronach Doktorantka podaje informacje dotyczące aspektów klinicznych endometriozy, teorii jej patogenezy, epidemiologii oraz postępowania leczniczego. Są to informacje syntetyczne, i choć jedynie na podstawowym poziomie akademickim to pozwalają na sprawne wprowadzenie czytelnika w zasadniczą problematykę opracowania. Wydaje się jednak, że przedstawienie przesłanek do podjęcia badań nad osteopontyną wymagałoby nieco szerszego omówienia aniżeli to, zawarte w ośmiu wierszach, które zredagowała Doktorantka.

Cel pracy zredagowany jednoznacznie, choć Doktorantka nie uniknęła także w tym krótkim rozdziale pomyłek literowo-składniowych („celami szczegółowymi jest:"), zaś inne sugestie podałem powyżej. Klasycznie w zwyczaju akademickim pojawiają się wyodrębnione hipotezy badawcze - w przedłożonej rozprawie nie znajdujemy ich co prawda w wydzielonej formie, jednak sformułowania celu badań umożliwiają orientację w kierunkach analiz.

Kolejne 5 stron zajmuje rozdział „Materiał i metodyka" - w którym zarówno grupa badana jak i kontrolna zostały scharakteryzowane wystarczająco dokładnie (z jedną uwagą zawartą powyżej), zaś opis zastosowanych technik badawczych jest jednoznaczny i pozwala na ewentualną weryfikację spostrzeżeń.

Rozdział „Omowienie wyników" - zajmujący 10 stron maszynopisu - przynosi podsumowanie rezultatów badań zilustrowanych dobrze dobranymi rycinami. Na kolejnych 8 stronach - w rozdziale „Dyskusja" - Autorka syntetycznie i z dużym krytycyzmem odnosi wyniki uzyskane w badaniach własnych do bogatego piśmiennictwa. Po rozdziale „Wnioski" - omówione już powyżej - oraz streszczeniu w języku polskim i angielskim znajdujemy wykaz piśmiennictwa zredagowanego konsekwentnie, choć nie bez drobnych uchybień, według systemu Vacnouver i obejmujący 114 pozycji, w przeważającej części pochodzących z ostatnich 10 lat. Napotykamy w nim także prace historyczne (np. z roku 1984 lub z 1927 - pozycja nr 10, co zakrawa na błąd literowy).

Redakcja pracy jest poprawna, jednak wskazane byłoby usunięcie bardzo licznych błędów literowych pojawiających się praktycznie na każdej stronie oraz zamiana podpisów z „Rysunek" na rycina, klasycznie używanych w tego typu opracowaniach

Konkluzja końcowa.

Oceniając całość przedłożonej do recenzji pracy stwierdzam, że Autorka wykazała zdolność do samodzielnego zaprojektowania badania naukowego, zrealizowała je zgodnie z zasadami obowiązującymi w pracy naukowej, wykazała rozległą wiedzę w zakresie znacznie przekraczającym ścisłą tematykę rozprawy, dysponuje umiejętnością korzystania z naukowych zasobów literaturowych. Autorka udowodniła krytycyzm i sumienność zarówno w prowadzeniu badania naukowego jak i we wnioskowaniu opartym na jego wynikach.

Uważam, że praca lekarz Joanny Figuły spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim, stąd wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z wyrazami szacunku

Lublin, 10.08.2019 Dr hab.n. med. Marek Sikorski, prof. nadzw. UJK