



Wrocław, 15.07.2025

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr farm. Alicja Sztokfisz-Ignasiak pt. Rola chromograniny A w patogenezie endometriozy przedstawionej do obrony przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

1. Ocena formalna

Przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska jest oficjalnie przesłanym drogą mailową z adresu Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego plikiem pdf, obejmującym 91 stron z wyodrębnionymi rozdziałami typowymi dla prac doktorskich przedstawianych w postaci monografii. Opracowanie zawiera 31 rycin i 8 tabel oraz 188 pozycji piśmiennictwa. Praca jest kompletna, układ rozdziałów jest zrównoważony. Praca jest opracowana starannie, nieliczne błędy leksykalne (np. przeciwciała prozapalne czy ekspresja genów przeciwzapalnych) nie uchybiają ogólnemu pozytywnemu odbiorowi pracy.

2. Ocena osiągnięcia naukowego

Endometrioza jest chorobą polegającą na występowaniu komórek błony śluzowej macicy – endometrium poza jamą macicy. Jest to choroba przewlekła, zapalna, do tej pory nieuleczalna trwająca przez całe życie dotkniętej ją kobiety. Przyczyna tej choroby nie jest znana. Najczęściej uznaje się, że wsteczna menstruacja i przedostawania się komórek błony śluzowej macicy przez jajowody do jamy otrzewnowej umożliwia ich zasiedlanie i rozrost. Kontrargumentem dla tej teorii jest fakt, że wsteczna menstruacja występuje u bardzo wielu kobiet a endometrioza dotyczy 10% populacji kobiet. Dlatego muszą istnieć inne czynniki predysponujące i decydujące o ektopowym zasiedlaniu narządów przez komórki endometrium. Wśród nich wyróżnia się predyspozycje genetyczne, warunki towarzyszące ontogenezie komórek macicy w trakcie życia płodowego i po urodzeniu dziewczynki, czynniki immunologiczne, hormonalne, środowiskowe i inne o nieznanym pochodzeniu. Dodatkowo jest to choroba diagnostycznie trudna. Ostateczna diagnoza jest podejmowana na podstawie wyników badań ultrasonograficznych i TK a także oceny histologicznej tkanek pobranych w przebiegu zabiegów laparoskopii. Dlatego, wiele ośrodków naukowych podejmuje wysiłki, które mogłyby wspomóc diagnostykę i prognozowanie endometriozy w oparciu o metody nieinwazyjne.

Badania Pani mgr Alicja Sztokfisz-Ignasiak wpisują się w ten nurt. Zwrócenie uwagi na biologię i zmiany w fenotypie komórek endometrium ektopowego w porównaniu z endometrium eutopowym jest jednym z ważniejszych kierunków podejmowanych badań.

Komórka endometrium ektopowego podlega wielu zmianom o wybitnie plejotropowym charakterze. Obserwuje się między innymi ich zwiększoną zdolność



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
im. Ludwika Hirsztfeldta
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
LABORATORIUM IMMUNOLOGII ROZRODU
ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław
tel. (+48) 337 11 72 wew. 358

do proliferacji przy obniżonej wrażliwości na apoptozę, zwiększony potencjał inwazyjny i zmianę ekspresji cząsteczek adhezyjnych, zwiększoną skłonność do przejścia epitelio-mezenchymalnego, zmianę w ekspresji receptorów dla estrogenów i progesteronu, syntezę czynników prozapalnych i angiogennych z jednoczesną promocją tolerancji immunologicznej i ucieczki spod kontroli immunologicznej.

Z drugiej strony pleiotropowe oddziaływanie chromograniny A i jej pochodnych często zbieżne z mechanizmami wywołującymi zmianę fenotypu komórek endometrium u kobiet z endometriozą były ważną przesłanką podjęcia badań nad udziałem tego białka w etiopatogenezie endometriozy. Wyjaśnienie skomplikowanych mechanizmów oddziaływania chromograniny A i jej pochodnych znajdujemy w wyczerpującym wstępie dysertacji doktorskiej.

Najważniejszym osiągnięciem tej pracy jest wskazanie po raz pierwszy obecności chromograniny A w komórkach endometrium ektopowego i zwiększonego stężenia tego białka i jego pochodnych w surowicy krwi i płynie otrzewnowym pacjentek z endometriozą. Nie jest jasne, dlaczego komórki endometrium pochodzące ze zmian endometriotycznych podejmują i zwiększają syntezę tego białka zachowując się podobnie do komórek podlegających różnicowaniu neuroendokrynnemu w tym komórek nowotworowych. Jednak wyniki badań Pani mgr Alicja Sztokfisz-Ignasiak wskazują również, że obecność chromograniny A w ogniskach endometriozy może mieć znacznie nie tylko w miejscowym rozwoju tej choroby, ale również w oddziaływaniach ogólnoustrojowych przyczyniając się do złożonego klinicznego obrazu tej choroby. Te ostatnie są pochodną proteolitycznego rozkładu chromograniny A do aktywnych peptydów o działaniu między innymi: proangiogennym, prozapalnym, stymulującym proliferację i zmieniającym metabolizm komórek. Autorka pracy potwierdziła ich obecność zarówno w surowicy krwi jak i w płynie otrzewnowym jednocześnie wskazując silną korelację pomiędzy ich stężeniami w obu wskazanych kompartmentach. Ten wynik wspiera założenie, że ogniska endometriozy są źródłem chromograniny A. Wyniki badań przedstawione w dysertacji wskazują na nowe cechy fenotypowe komórek endometrium ektopowego i poszerzają wachlarz markerów w nieinwazyjnej diagnostyce endometriozy.

Zastosowane metody doświadczalne zostały odpowiednio dobrane do celów pracy i obejmowały standardowe testy pozwalające na ocenę ekspresji genu chromograniny A i białek pochodnych w tym badanie immunocytochemiczne, testy ELISA i testy RT-qPCR. Analiza uzyskanych wyników została poparta testami statystycznymi oraz analizą ROC. Na podstawie przedstawionych wyników z pewnością można uznać, że wszystkie założone cele pracy zostały osiągnięte.

Wykazano bowiem zwiększoną obecność chromograniny A w preparatach histologicznych endometrium ektopowego w porównaniu z endometrium eutopowym,



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
im. Ludwika Hirszfelda
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
LABORATORIUM IMMUNOLOGII ROZRODU
ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław
tel. (+48) 337 11 72 wew. 358

potwierdzono obecność i wykazano zwiększone stężenie chromograniny A i jej pochodnych z wyjątkiem wazostatyny II w surowicy pacjentek z endometriozą w porównaniu do grupy kontrolnej, przedstawiono szereg korelacji wskazujących na prawdopodobne zależności pomiędzy produkcją chromograniny A przez endometrium kobiet z endometriozą i jej obecność w płynach ustrojowych: surowicy i płynie otrzewnowym, zależność pomiędzy intensywnością syntezy i stopniem rozwoju endometriozy, na podstawie analizy krzywych ROC wykazano potencjalną przydatność oznaczania chromograniny A w surowicy i płynie otrzewnowym a także w mniejszym stopniu pankreastatyny i katestatyny w diagnostyce endometriozy. Ponadto wskazano potencjalny mechanizm indukcji lub wzmocnienia ekspresji chromograniny A w komórkach ustalonych linii komórkowych 12Z oraz Ishikawa na podstawie względnej ekspresji mRNA dla tego białka po stymulacji cytokinami prozapalnymi.

Jednak w opisie wyników i w dyskusji występują uchybienia i brakuje niektórych informacji, których sugestie zmian i uzupełnień przedstawiam poniżej:

- a) badania zostały przeprowadzone na materiale pobranym od 125 pacjentek z endometriozą i pacjentek kontrolnych nie wykazujących objawów tego schorzenia. Badanie zostało przeprowadzone za zgodą komisji bioetycznej. Opis pacjentek zawarty w tabeli obejmuje podstawowe informacje dotyczące wieku, indeksu BMI, diety, niepłodności i liczby pacjentek kwalifikowanych do grup oraz lokalizacji zmian endometriotycznych. Brakuje jednak dokładnej informacji o kryteriach wykluczenia z badania i przyczynach interwencji chirurgicznych w grupie pacjentek kontrolnych. Częściowo informacje te zostały podane w dyskusji wyników, jednak biorąc pod uwagę występowanie i zmiany w stężeniu chromograniny A w bardzo wielu stanach patologicznych szczegółowy opis kryteriów kwalifikacji pacjentek jest niezbędny dla potwierdzenia źródła pochodzenia chromograniny A w przebiegu endometriozy.
- b) w opisie wykresów nr 4,5,6,1,3,14,15,1,6 brakuje wskazania liczby pacjentek poddanych analizie. Szczególnie jest to istotne w przypadku analizy płynu otrzewnowego, gdyż można sądzić, że w grupie kontrolnej liczba pacjentek poddanych badaniu mogła być istotnie mniejsza
- c) bardzo starannie dobrane reprezentatywne preparaty histologiczne wyraźnie wskazują tendencję zmian i wskazują na zwiększoną ekspresję chromograniny A w tkance ektopowego endometrium. Jednak w opisie wyników badania immunocytochemicznego brakuje analizy i opisu u ilu pacjentek wykonano badanie i u ilu z nich obserwowano ekspresję chromograniny A, ile preparatów zostało poddanych analizie, nie wiadomo czy i jak zmieniała się ekspresja chromograniny A w zależności od lokalizacji i stopnia zaawansowania endometriozy. Brak takiej analizy podważa wartość badania immunocytochemicznego i wniosek wskazujący, że źródłem podwyższonego



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
im. Ludwika Hirsztfeldta
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
LABORATORIUM IMMUNOLOGII ROZRODU
ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław
tel. (+48) 337 11 72 wew. 358

- stężenia chromograniny A w surowicy i płynie otrzewnowym jest tkanka endometrium ektopowego
- d) w opisie wykresu powinno być RT-qPCR zamiast RT-PCR a także w określeniu względnej ekspresji genu brak jest informacji o kryteriach doboru genu referencyjnego zarówno dla prób pochodzących z endometrium jak i linii komórkowych
 - e) w pracy wykonano testy ELISA, w których wykazano podwyższone stężenie pochodnych chromograniny A w surowicy i płynie otrzewnowym. Cennym uzupełnieniem badań byłoby przeprowadzenie testu Western Blotting w lizatach skrawków tkankowych lub lizatach komórkowych z użytych w pracy linii komórkowych. Badanie takie mogłoby wskazać czy pochodne rozpadu chromograniny A powstają w komórkach endometrium czy białko to ulega rozkładowi proteolitycznemu pozakomórkowo.
 - f) w dyskusji nad możliwymi przyczynami zwiększonej syntezy chromograniny A dobrym uzupełnieniem byłaby analiza aktywacji jej promotora. Według Canaf i wsp. 1998 aktywacja tego białka następuje wskutek obecności w promotorze sekwencji CRE. Liczne ścieżki prowadzące do aktywacji tego czynnika mogą pochodzić nie tylko od receptorów dla cytokin i czynników wzrostu, ale również pośrednio od estrogenów. Tak więc biorąc pod uwagę estrogenowo zależny charakter tego schorzenia doświadczenie in vitro mogłoby być uzupełnione o stymulację komórek estrogenami. Wydaje się, że zbadanie warunków aktywacji promotora tego białka w ogniskach endometriotycznych jest kluczem do rozumienia zwiększonej produkcji chromograniny A przez komórki endometrium. Nie będzie to zadania łatwe, ponieważ nie jasne jakie sekwencje i czynniki transkrypcyjne mogą wiązać się z sekwencją CRE w promotorze chromograniny A. Nie mniej jednak w pracy Brałewska i wsp. 2023 wskazano na liczne ścieżki prowadzące do aktywacji promotora tego białka co może być wskazówką do dalszych badań.

Wszystkie powyższe uwagi nie umniejszają wartości tej pracy. Mam nadzieję, że będą służyły autorce w procesie przygotowania pracy do druku a uwagi o charakterze problemowym będą pomocne w kontynuacji tych ważnych badań nad udziałem chromograniny A w etiopatogenezie endometriozy.

3. Wniosek końcowy

Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr farm. Alicji Sztokfisz-Ignasiak pt. „Rola chromograniny A w patogenezie endometriozy” jest źródłem nowej wiedzy przyczyniającej się do zrozumienia przyczyn rozwoju endometriozy i spełnia warunki określone w art. Art. 187 ust.1-4 Ustawy z dnia 20 lipca 2018r Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz. U.2018 poz.1668). Zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Medyczne Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
im. Ludwika Hirsztfeldta
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
LABORATORIUM IMMUNOLOGII ROZRODU
ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław
tel. (+48) 337 11 72 wew. 358

dopuszczenie Pani mgr farm. Alicji Sztokfisz-Ignasiak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Anna Chelmańska-Soyta