

Prof. dr hab. n. med. Sławomir Wołczyński

Klinika Rozrodczości i Endokrynologii Ginekologicznej

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr farm. Alicja Sztokfiisz-Ignasiak

„Rola chromograniny A w patogenezie endometriozy”,

wykonanej pod kierunkiem dr hab. n. med. Izabeli R. Janiuk

Endometrioza pozostaje zagadkową chorobą. Przyjęta definicja określa ją jako łagodną, przewlekłą, zapalną estrogenozależną chorobę wywołaną obecnością tkanki endometrium poza jamą macicy. Choroba jest łagodna, ale objawy kliniczne są bardzo uciążliwe. Kobiety z endometriozą zgłaszają objawy bólowe, w tym bolesne miesiączkowanie, dyspareunię i przewlekły ból w podbrzuszu, zmęczenie. Dodatkowo endometrioza obniża szansę na zajście w ciążę. U niektórych pacjentek endometrioza przebiega bezobjawowo. Główne objawy endometriozy wywierają głęboki negatywny wpływ na jakość życia pacjentek (QoL), interakcje społeczne i dobre samopoczucie seksualne. Patogeneza endometriozy pozostaje niewyjaśniona i leczenie może być tylko objawowe. Z punktu klinicznego, skuteczne leczenie powinno zaczynać się od zajęcia się tymi podstawowymi objawami – bólem i niepłodnością – poprzez leczenie dostosowane do wieku każdej pacjentki, rezerwy jajnikowej i celów prokreacyjnych. Największym wyzwaniem a jednocześnie najbardziej fascynującym zadaniem jest poznanie biologii ognisk endometriozy. Pozwoli to na zidentyfikowanie głównych szlaków molekularnych regulujących procesy w ogniskach endometrialnych: zrozumienie, czym jest ta choroba i opracowanie leczenia przyczynowego.

W tę tematykę badawczą wpisuje się praca doktorska mgr Alicji Sztokfiisz-Ignasiak „Rola chromograniny A w patogenezie endometriozy” wykonana pod kierunkiem dr hab. n. med. Izabeli R. Janiuk. Z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę, że tak sformułowany tytuł niezbyt dobrze oddaje zakres przeprowadzonych badań. Patogeneza to opis mechanizmów, za pomocą których badany czynnik wywołuje chorobę i wpływa na jej rozwój. Wymaga to pokazania funkcjonalnej roli chromograniny A i jej bioaktywnych peptydów w endometriozie. Poznanie roli chromograniny A w patogenezie endometriozy to temat na kontynuację badań przez Doktorantkę

na kolejne lata kariery naukowej. Tytuły *Ekspresja chromograniny A w ogniskach endometriozy* lub *Chromogranina A i jej bioaktywne fragmenty peptydowe jako potencjalne markery w endometriozie* w mojej opinii zdecydowanie lepiej charakteryzują pracę.

Przedstawiona do recenzji praca liczy 91 stron i ma typową strukturę. Pracę otwierają: wykaz używanych skrótów streszczenia w języku polskim i angielskim oraz rozdziały – 1. Wstęp, w którym doktorantka przedstawia przegląd piśmiennictwa, 2. Założenia i cele, 3. Materiały i metody, 4. Wyniki, 5. Dyskusja, 6. Podsumowanie i wnioski oraz Piśmiennictwo (188 pozycji). W pracy jest 31 rysunków i 8 tabel. W przeglądzie piśmiennictwa doktorantka przedstawia podstawowe informacje o endometriozy oraz o chromograninie A. W opinii recenzenta w przeglądzie piśmiennictwa informacje o epidemiologii, teoriach powstawania endometriozy, leczeniu, niepłodności należałoby skrócić maksymalnie a przedstawić rozdział o innych istotnych czynnikach (tkankowych markerach) w ogniskach endometriozy odgrywających rolę w biologii ognisk endometriozy np. aromataza, FSHR, BDNF, receptor estrogenowy beta, receptory progesteronowe itd. Bez tych informacji nagłe pojawienie się informacji o chromograninie A wydaje się nieoczywiste. Rozdziały o chromograninie A napisane są poprawnie, ale jest błąd wynikający prawdopodobnie z nieuwagi – chromogranina A nie jest syntezowana w jądrze.

Celami badań podjętych przez Doktorantkę były:

- immunohistochemiczna (IHC) identyfikacja CgA oraz zbadanie ekspresji genu *CHGA* za pomocą łańcuchowej reakcji polimerazy z analizą w czasie rzeczywistym (RT-PCR) w zmianach endometrioidalnych oraz endometrium eutopowym pobranym od zdrowych pacjentek,
- określenie obecności, stężenia oraz wzajemnej korelacji CgA i produktów jej proteolizy: CST, PST i VS-II w surowicy i płynie otrzewnowym pobranych zarówno od pacjentek ze zdiagnozowaną endometriozą, jak i zdrowych, przy użyciu testów immunoenzymatycznych ELISA,
- próba określenia potencjalnego mechanizmu odpowiedzialnego za ekspresję CgA za pomocą badań na hodowlach komórkowych.

Badania przeprowadzono w grupie 125 pacjentek hospitalizowanych w jednostkach klinicznych dwóch warszawskich Klinik Uniwersytetu Medycznego w Warszawie. W opisach, w całym tekście usunąłbym określenie: „przypadki” (nie liczba przypadków a liczba badanych), „w przypadku” („W przypadku CST istotnie zwiększone stężenie tego peptydu w porównaniu do grupy kontrolnej odnotowano w surowicy ($p=0,0278$; Rycina 22A) i w płynie otrzewnowym ($p=0,0081$ ”); Po polsku poprawniej - *W płynie otrzewnowym i surowicy odnotowano zwiększone stężenie CST w grupie z endometriozą w porównaniu do grupy kontrolnej.* Proponuję nie używać „poziom” (kalka z angielskiego) a „stężenie”.



W metodyce badań Doktorantka stosowała metody immunoenzymatyczne i reakcję odwrotnej transkrypcji łańcuchowej, reakcje polimerazy z analizą w czasie rzeczywistym i hodowlą komórkową.

Przedstawiając badania immunohistochemiczne należy nie tylko napisać, że sprawdzono reakcję w tkance o znanej ekspresji chromograniny A i tkance z brakiem ekspresji, ale przedstawić wynik. W opinii recenzenta w przygotowaniu pracy do druku należałoby uzupełnić badania np. o analizę, czy istnieje zależność ekspresji CgA, stężeniem bioaktywnych produktów a nasileniem bólu albo zależności między ekspresją CgA a np. ekspresją aromatazy, FSHR, BDNF, neurogenezą w ognisku. W pracy nie znalazłem jednoznacznej odpowiedzi na pytanie, czy w endometrium pacjentek z endometriozą ekspresja immunohistochemiczna lub RNA CgA jest taka sama jak w grupie kontrolnej? Ważną częścią pracy jest analiza wyników badań nad ekspresją CgA pod wpływem cytokin prozapalnych przeprowadzone w hodowlach komórkowych *in vitro*.

W dyskusji Doktorantka przedstawiła ewentualną rolę CgA w endometriozie. Szczególną uwagę w dyskusji skoncentrowała nad wpływem wazostatyny I, wazostatyny II, chromofunginy (47-66), chromacyny, prochromacyny, pankreastatyny, katestatyny, serpininy oraz WE-14. Omówiła też znaczenie mikrośrodowiska ognisk endometriotycznych.

Pracę kończy podsumowanie i wnioski:

1. W skupiskach komórek nabłonka gruczołowego tkanki pobranej od pacjentek z endometriozą zidentyfikowano obecność chromograniny A, natomiast w endometrium eutopowym u pacjentek z grupy kontrolnej białko to występuje tylko w pojedynczych komórkach.
2. Zarówno w surowicy, jak i w płynie otrzewnowym pacjentek ze zdiagnozowaną endometriozą zaobserwowano istotnie wyższe stężenia chromograniny A oraz jej pochodnych: katestatyny i pankreastatyny, ale nie wazostatyny II w porównaniu do surowicy i płynu otrzewnowego pobranych od pacjentek z grupy kontrolnej.
3. Nie wykazano istotnych różnic ekspresji mRNA dla genu *CHGA* we fragmentach torbieli endometrialnych pobranych od pacjentek z endometriozą w porównaniu do endometrium eutopowego pacjentek zdrowych.
4. Podwyższoną ekspresję genu *CHGA* zaobserwowano w komórkach 12Z po stymulacji IL-1 oraz w komórkach Ishikawa po stymulacji TNF. Obniżoną ekspresję wykazano po inkubacji komórek Ishikawa z TGFβ.
5. Na podstawie wyników przeprowadzonych badań można przypuszczać, że chromogranina A może odgrywać istotną rolę w etiopatogenezie endometriozy oraz, że zarówno CgA, jak i jej pochodne obecne w płynach ustrojowych mogą być obiecującym wskaźnikiem w małoinwazyjnej diagnostyce tej choroby oraz/lub potencjalnym celem terapeutycznym.



Doktorantka nie ustrzegła się bardzo często popełnianego błędu, przedstawiając skrócony opis wyników jako wnioski - wymaga to przemyślenia i przeredagowania. Wyniki powinny posłużyć do przedstawienia wniosków.

Podsumowując, stwierdzam, że Doktorantka dysponuje dobrym warsztatem i osiągnęła stopień dojrzałości i samodzielności naukowej uprawniający ją do ubiegania się o stopień doktora. Opisała ekspresję CgA w ogniskach endometriotycznych i zwiększoną obecność jej bioaktywnych produktów proteolizy w płynie otrzewnowym i surowicy krwi u pacjentek z endometriozą oraz udział czynników prozapalnych w regulacji ekspresji CgA. Uważam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska jest nowatorskim oryginalnym osiągnięciem Autorki (mimo, że wskazałem na szereg uchybień i konieczność uzupełnienia wyników o dalsze badania) oraz spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668). W związku z tym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Warszawie o dopuszczenie mgr farm. Alicji Sztokfisz-Ignasiak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.