

Białystok, 18.08.2023

Ocena

Rozprawy doktorskiej mgr Agnieszka Anna Koppolu

Somatyczne mutacje powiązane z onkogenezą w patogenezie endometriozy

Ognisko endometriozy w rozumieniu obrazu mikroskopowego to fragment błony śluzowej trzonu macicy wraz z podścieliskiem w innej lokalizacji niż trzon macicy (zwanej endometrium). Z punktu diagnostyki patomorfologicznej jest to zmiana, która nie stanowi zwykle dużego wyzwania dla doświadczonego lekarza patomorfologa. Inną jednak sprawą jest wysnuć podejrzenia przez klinicystę, że pacjentka choruje na endometriozę a jeszcze bardziej złożonym problemem jest odpowiedzenie na pytanie czy i dlaczego mogłyby się pojawić zaburzenie w postaci endometriozy u badanej kobiety.

Przyjmuje się, że endometrioza dotyczy >170 milionów kobiet na świecie, przeważnie w wieku rozrodczym (10% kobiet w tej grupie wiekowej). Pośród teorii powstania endometriozy kluczowa wydaje się zaproponowana przez Sampson'a teoria menstruacji wstecznej i implantacji. Zakłada ona, że w trakcie menstruacji część komórek warstwy czynnościowej błony śluzowej macicy wydostaje się do jamy otrzewnej przez jajowód. Endometrioza bowiem może przybierać postać powierzchniową lub głęboką. Należy podkreślić, że endometrioza głęboka zaliczana jest do najcięższych form endometriozy. Jednocześnie szeroko dyskutowana w piśmiennictwie jest jako choroba wielogenowo/wieloczynnikowa. Gdzie aż w 51% mówi się o czynnikach genetycznych jako ryzyko jej powstania. Wykazano także różnice w ekspresji genów między EU (eutopic endometrium) pacjentki chorej na endometriozę i zdrowej kobiety. U pacjentek z endometriozą komórki EU (endometrium eutopowe) charakteryzuje nieprawidłowo podwyższony poziom reaktywnych form tlenu, który zaburza prawidłową strukturę białek, tłuszczu oraz DNA, co może nieprawidłowo wpływać na cykl komórkowy. Tak informuje nas doktorantka w obszernym wstępie rozprawy doktorskiej. Ponad to z występowaniem endometriozy i stanem zapalnym, który jej towarzyszy wiąże się podwyższony poziom markerów stanu zapalnego takich, jak cytokiny, prostaglandyny czy metaloproteiny. Konsekwencją ciągłych procesów zapalnych jest zwłóknienie tkanki na skutek

powtarzających się cykli uszkodzenia i naprawy tkanek. Czynnikiem inicjującym procesy zwłóknienia są płytki krwi, których aktywacja prowadzi do lokalnego podwyższenia stężenia transformującego czynnika wzrostu (TGF- β), odkładania kolagenu i formowania się trwałych blizn. Choć wydawać by się mogło posiadana przez nas dość szczegółowa wiedza, związana z biologią tego zjawiska, wciąż pozostawia znaki zapytania dotyczące jego przebiegu klinicznego.

Dlatego też uważam, że wybór tematu pracy doktorskiej przez mgr Agnieszka Anna Koppolu jest w pełni uzasadniony, interesujący i bardzo aktualny.

Przedstawiona mi do oceny praca ma typowy układ dla rozpraw doktorskich i została podzielona na części: wstęp, cele i założenia pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusja, wnioski oraz piśmiennictwo.

Rzetelnie napisany obszerny wstęp zajmuje 28 stron. Podzielony został na 12 części. Kolejno zostają omówione najważniejsze zagadnienia dotyczące anatomii, fizjologii i patofizjologii związanej z endometriozą.

Szeroko doktorantka opisuje hipotezy powstania endometriozy z najstarszymi doniesieniami włącznie notowanymi na 1500 p.n.e. w kolejnych podrozdziałach opisuje epidemiologię oraz społeczno-ekonomiczne skutki endometriozy. Co istotne doktorantka dostrzega problemy pacjentek chorujących na endometriozę a wyrażonych przede wszystkim problemami zajścia w ciążę w tej grupie kobiet. Można powiedzieć, że szczególnie w obecnej dobie gdy coraz częściej kobiety zmagają się z tym problemem temat dysertacji jest bardzo aktualny i ważny. Jednocześnie w świetle najnowszych badań doktorantka podaje, że istnieją powiązania pomiędzy występowaniem endometriozy i chorób autoimmunologicznych. Warto zauważyć, że endometrioza jest uważana, za niezdolną chorobę przerzutową. W jej przebiegu obserwuje się cechy typowe dla rozwoju guza: angiogenezę, adhezję, rozrost, inwazję i migrację a nawet przerzuty do węzłów chłonnych i regionów znajdujących się poza jamą brzuszną. O czym dość obszernie pisze doktorantka.

Z ogromną pieczołowitością doktorantka przedstawił informacje na temat znaczenia genetyki w patogenezie endometriozy. Informując nas, że badania asocjacyjne całego genomu (GWAS, *ang. genome-wide association study*) pozwoliły zidentyfikować regiony genomu potencjalnie powiązane ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na endometriozę. Wytypowano, między innymi, obszary zawierające geny *WNT4*, *GREB1*, *ID4*, *CDKN2BAS*,

VEZT, FN1, czy IL1A. Przypuszcza się również, że regiony genomu mające znaczenie w etiologii endometriozy mogą znajdować się w sekwencjach intronowych i regulatorowych, których warianty skutkują zmianą ekspresji genów. Doktorantka zapoznaje nas z definicją mutacji somatycznej i germinalnych. W dalszej części opisuje technologie ułatwiające wykrywanie mutacji somatycznych które można podzielić na mające na celu zwiększenie czułości metod uniwersalnych oraz te, których efektem jest ograniczenie populacji komórek poddawanych badaniu. Jednocześnie co ważne przykładem strategii obieranej w celu wykrycia mutacji somatycznych jest wykonanie głębokiego NGS tak, aby uzyskać pokrycie >100x (nawet do kilku tysięcy razy) pozwalające na wykrycie mutacji o VAF \geq 1%. W celu uzyskania wysokiego pokrycia wybranej sekwencji genomu konieczne jest wielokrotne powielenie wejściowego DNA. Jak się dowiadujemy z dalszej części pracy doktorskiej. Co niezmiernie istotne według doktorantki to weryfikacje obecności mutacji somatycznych oraz dokładniejsze oznaczanie VAF które można przeprowadzać z wykorzystaniem metody głębokiego sekwencjonowania ampliconów (ADS, *ang. amplicon deep sequencing*), generując zwiększone pokrycie badanego regionu rzędu kilkudziesięciu tysięcy razy. Inną przydatną techniką jest PCR emulsyjny (ddPCR, *ang. droplet digital PCR*) będący modyfikacją klasycznej reakcji PCR, używany do ilościowej oceny produktu. Czulość tej metody jest zwiększona poprzez podział badanej próbki na ok. 20 000 kropli, w których niezależnie zachodzą reakcje amplifikacji matrycy DNA. W kolejnej części zapoznajemy się z mikro laserowym pozyskiwaniem mikroskrawków (laserowa mikrodysekcja, LCM, *ang. laser capture microdissection*) to technika umożliwiająca izolację poszczególnych komponentów tkanek (np. pełniących konkretną funkcję) lub konkretnych populacji komórek, z dokładnością do pojedynczej komórki.

Chociaż endometrioza jest uważana za chorobę niezłośliwą z bardzo niskim ryzykiem przekształcenia w zmianę nowotworową, w tkankach endometrialnych u kobiet, u których nie stwierdzono nowotworu, występują mutacje somatyczne powiązane z onkogenezą.

Po bardzo szczegółowym wprowadzeniu Doktorantka przybliży cele swej pracy doktorskiej.

Główny cel niniejszej pracy to:

1. Zbadanie, czy mutacje somatyczne endometrium pacjentek z endometriozą głęboką występują w homogenizowanej tkance i/lub w izolowanych gruczołach endometrium

Szczegółowe cele niniejszej pracy obejmują:

2. Zbadanie, czy istnieje zależność między występowaniem mutacji w genach bezpośrednio zaangażowanych w onkogenezę a typem endometrium (EK / EU)
3. Weryfikacja hipotezy zakładającej obecność mutacji somatycznych w genach zaangażowanych w procesy towarzyszące onkogenezie, jako przyczyny endometriozy głębokiej
4. Weryfikacja hipotezy zakładającej istnienie wspólnych mutacji somatycznych w gruczołach EK i EU, które wskazują na wspólne pochodzenie tych tkanek

Należy podkreślić nowatorskość celu badań oceny obecności mutacji w przebiegu endometriozy .

Materiał do badań stanowiły fragmenty EK (endometrium ektopowe) i EU (endometrium eutopowe) oraz krew obwodowa (K) pacjentek z potwierdzoną laparoskopowo głęboką endometriozą. Warunkiem zakwalifikowania materiału do dalszych badań było mikroskopowe potwierdzenie obecności gruczołów endometrium w pobranych wycinkach tkanek oraz skuteczna ekstrakcja DNA z pobranych tkanek.

Grupę badaną stanowiło 28 pacjentek z potwierdzoną przez laparoskopową i histologiczną ocenę tkanek głęboką endometriozą przestrzeni odbytniczo pochwowej. Pacjentki hospitalizowane były w Oddziale Ginekologicznym Szpitala im. Św. Zofii w Warszawie. Wszystkie pacjentki podpisały świadomą zgodę uczestnictwa w badaniu zgodnie z Deklaracją Helsińską. Projekt badania uzyskał pozytywną opinię i zgodę Komisji Bioetycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (KB/223/2009) i Wojskowego Instytutu Medycznego w Warszawie (49/WIM/2011, 37/WIM/2013).

W metodyce doktorantka bardzo dokładnie charakteryzuje i opisuje przebieg badań w swojej części laboratoryjnej. Zawiera szczegółowy opis pozyskiwania materiału do badań molekularnych metodą LCM (Laser capture microdissection). W części dalszej zapoznaje nas z procedurą WGA, sekwencjonowaniem następnej generacji. Oceniając tę część rozprawy doktorskiej pragnę podkreślić, że świadczy ona o dużej wiedzy doktorantki o badanym zagadnieniu oraz o umiejętności postępowania się metodami analitycznymi jak i literaturą naukową. Stanowi ona uzasadnienie podjęcia badań naukowych w tym zagadnieniu.

W przejrzysty sposób nakreślone cele pracy doktorskiej i przez szczegółowy opis metodyki przeprowadza czytającego do obszernie opracowanych uzyskanych wyników w grupie badanej.

Wyniki badań własnych doktorantka przedstawia w formie opisowej oraz w tabelach i rycinach. Dla mnie jako patomorfologa wszystkie wyniki są w doskonały sposób sprecyzowane i z dokładnością zegarmistrzowską przedstawione.

W obszernej dyskusji doktorantka bardzo szczegółowo omawia uzyskane wyniki badań własnych uwzględniając nowe trendy postępowania w diagnozowaniu i leczeniu chorych z endometriozą.

Wyniki badań własnych doktorantka porównuje z badaniami autorów zajmujących się tym problemem. Sposób przeprowadzenia dyskusji jak również rzeczowy komentarz oceniający badania własne świadczy o dobrym przygotowaniu doktorantki do pracy naukowej i umiejętności posługiwania się literaturą naukową. Piśmiennictwo obejmuje bardzo szeroki zakres literatury naukowej dotyczącej badanego zagadnienia liczy aż 117 pozycji.

Przeprowadzone badania i analiza statystyczna pozwoliły mgr Agnieszce Annie Koppolu na wyciągnięcie czterech kluczowych wniosków z których wynika, że

1. W homogenizowanej tkance endometrium pacjentek z endometriozą głęboką zawierającej zarówno komórki gruczołów jak i zrębu nie wykryto zmian somatycznych, natomiast izolacja pojedynczych gruczołów endometrium umożliwiła wykrycie w nich somatycznych mutacji w zakresie czułości wykorzystanych metod
2. W gruczołach EK endometriozy głębokiej szansa, że mutacja wystąpi w genie sprawczym jest statystycznie istotnie wyższa, niż że wystąpi w genie z grupy pozostałych. W gruczołach EU endometriozy głębokiej szansa, że mutacja wystąpi w genie sprawczym jest równa szansie wystąpienia mutacji w genie z grupy pozostałych, jednak nie wykazano istotności statystycznej
3. W EK wykryto mutacje somatyczne w genach sprawczych: *KRAS*, *TP53*, *NSD1*, *ATRX*, *ERBB3*, które mogą przyczyniać się do rozwoju endometriozy lub do wystąpienia choroby o wyższym stadium zaawansowania
4. Istnieją mutacje somatyczne występujące w gruczołach obu tkanek kobiet z endometriozą głęboką, o wyższym VAF w EU i niższej w EK, wskazujące na wspólne pochodzenie tych tkanek

UNIwersytet Medyczny w Białymstoku

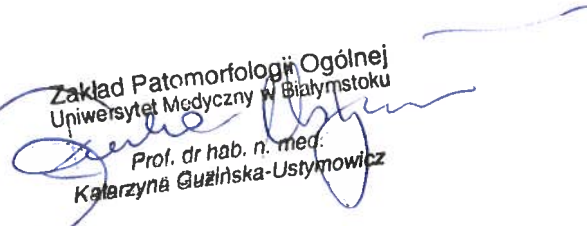
Zakład Patomorfologii Ogólnej

15-269 Białystok, ul. Waszyngtona 13
e-mail: patomorf.og@umb.edu.pl

tel. i fax: (085) 748 59 96
centr. AMB (085) 748 54 00

Rozprawę doktorską oceniam bardzo wysoko. Doktorantka postawiła sobie trudne, aktualne i potrzebne zadania badawcze, które w pełni zrealizowała odpowiadając na postawione pytania. Jednocześnie fakt opublikowania wyników pracy w prestiżowym czasopiśmie jakim jest Cells uważam za godne wyróżnienia przedstawionej mi do recenzji rozprawy doktorskiej.

Niniejsza praca doktorska wskazuje na znakomite przygotowanie teoretyczne Autorki oraz opanowanie przez nią warsztatu badawczego i umiejętności krytycznej analizy uzyskanych wyników. Przedstawiona do oceny praca doktorska pt.: **Somatyczne mutacje powiązane z onkogenezą w patogenezie endometriozy** spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Zgodnie z podstawą prawną art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn.zm.) oraz art.179 ust.1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r., postępowanie o nadanie stopnia doktora prowadzone jest na podstawie ustawy z dnia 20 lipca 2018r.prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1668 zezm.), dlatego wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pani mgr Agnieszki Anny Koppolu do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Zakład Patomorfologii Ogólnej
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Prof. dr hab. n. med.
Katarzyna Guzińska-Ustymowicz