

OCENA ROZPRAWY NA STOPIEŃ DOKTORA NAUK MEDYCZNYCH
LEK. SUSAN AFSHARI-STASIAK PT.:
„ANALIZA RECEPTORA FSH I CZYNNIKA NGF W ŚCIANIE TORBIELI
ENDOMETRIALNYCH JAJNIKA W METODZIE MIKROMACIERZY
TKANKOWYCH”.

Endometrioza stanowi problem zdrowotny kobiet, który mimo regularnie i sukcesywnie prowadzonych badań nad jej przyczynami, możliwością różnicowania z innymi chorobami oraz jej leczenia, nadal należy do największych wyzwań współczesnej ginekologii. Szacuje się, że choruje na nią od 10-12 % kobiet w wieku rozrodczym. Część z nich nie prezentuje objawów choroby, jednak wiele cierpi na przewlekłe bóle miednicy mniejszej, problemy gastryczne czy złe samopoczucie. Endometrioza jest również uważana jako jedna z głównych przyczyn niepłodności żeńskiej. To powoduje, że osoby chore na endometriozę mają obniżone poczucie własnej wartości, często ograniczają kontakty towarzyskie czy społeczne oraz wycofują się z intymnej relacji ze swoim partnerem czy z życia zawodowego. Jednym z zasadniczych problemów i wyzwań jakie stawia ta choroba przed lekarzami jest jej prawidłowe rozpoznanie. Z jednej strony, duża część kobiet czeka, nieraz wiele lat demonstrując niespecyficzne objawy, aż ktoś powiąże je z endometriozą. Z drugiej, nierzadka jest sytuacja nadużywania tego rozpoznania (zwłaszcza w ostatnich latach, kiedy coraz częściej się o tej chorobie mówi i słyszy), które w sytuacji innej przyczyny dolegliwości staje się trudnym do usunięcia stygmatem. Stąd też, wyraża się silna potrzeba identyfikacji czynników i markerów, które mogłyby zostać wykorzystane jako czułe i specyficzne indykatory obecności zmian endometriotycznych w organizmie. Znany od lat marker Ca-125 okazał się nie spełniać pokładanych w nim nadziei w tym zakresie. W chwili obecnej pojawiły się nowe testy wykorzystujące oznaczenie: 1. czynnika neurotroficznego pochodzenia mózgowego (BDNF) z osocza metodą ELISA [Herranz-Blanco B. Et al. *Biomolecules* 2023], 2. swoistego dla endometriozy podpisu molekularnego w oparciu o sekwencjonowanie mikroRNA ze śliny [Bendifallah S et al. *J. Clin. Med.* 2022] oraz 3. ekspresji fukosyltransferazy 4 (FUC4) w endometrium [Żeberkiewicz M et al. *J Clin Med.* 2022]. We wstępnych testach klinicznych każdy z

tych biomarkerów charakteryzował się statystycznie istotną dodatnią korelacją z występowaniem endometriozy, przy czym pierwszy z wymienionych, BDNF, wykazywał się największą swoistością spośród pozostałych. Niemniej, na chwilę obecną wciąż brak jest wystarczającego potwierdzenia skuteczności tych testów na reprezentatywnych populacjach w rozpoznawaniu endometriozy, a zwłaszcza w skutecznym różnicowaniu przyczyn pochodzenia przewlekłego bólu miednicy mniejszej. Nie jest to naturalnie pełny wybór możliwych substancji czy technik diagnostycznych, które mają szansę odgrywać kluczową rolę w rozpoznawaniu endometriozy. Przykładem może być receptor FSH oraz neuronowy czynnik wzrostu (NGF), których poziom ekspresji może mieć istotne kliniczne znaczenie w endometriozie, a które to markery stały się przedmiotem zainteresowań badawczych Doktorantki przedstawionych w niniejszej dysertacji.

Celem pracy, które określiła Doktorantka było:

- a) zbadanie ekspresji receptora FSH i czynnika NGF w torbielach endometrialnych, w porównaniu do innych torbieli jajnika.
- b) wykazanie korelacji między ekspresją receptora FSH i czynnika NGF w torbielach endometrialnych jajnika.

Celem drugorzędowym pracy było:

- a) wykazanie czy ekspresja receptora dla FSH oraz NGF zależy od obecności endometriozy otrzewnowej.
- b) wykazanie zależności pomiędzy objawami endometriozy a ekspresją receptora dla FSH oraz NGF w torbielach endometrialnych.

Całość pracy obejmuje 116 stron w klasycznym układzie dla dysertacji naukowych i zawiera **Wstęp, Założenia pracy, Materiał i Metodykę, Wyniki, Dyskusję, Wnioski, Piśmiennictwo**. Umieszczenie na początku pracy wykazu skrótów jest pomocne i ułatwia czytelnikowi zapoznanie się z treścią pracy.

Wstęp pracy jest zwięzły, zawiera ogólny opis endometriozy, postulowanych przyczyn jej powstawania, sposobów diagnozowania i leczenia. Znajduje się również informacja, dość lakoniczna co prawda na temat potencjalnej roli markerów, którymi

zajęła się Doktorantka w niniejszej dysertacji. Jakkolwiek ta część pracy jest dobrze napisana to jednak Doktorantka nie ustrzegła się kilku, a jednak istotnych nieścisłości. Zaraz w pierwszych akapitach wspomina, że laparoscopia pozostaje główną metodą dająca pewne rozpoznanie endometriozy [str. 14], co pozostaje w sprzecznością z ostatnio opublikowanymi wytycznymi [ESHRE guidelines. Hum Rep Open. 2022] i aktualną dobrą praktyką kliniczną. Również stwierdzenie, że przyczyną zmiany dogmatu rozpoznania endometriozy przy pomocy laparoskopii był koszt procedury oraz ryzyko powikłań nie jest do końca zgodne z prawdą. Zasadniczą przyczyną zamian był wzrost świadomości na temat ograniczeń w wizualizacji zmian głębokich podczas zabiegu operacyjnego [str. 22].

W rozdziale **Materiały i Metody** określono, że badanie przeprowadzono na grupie 101 pacjentek, które zostały podzielone na 4 podgrupy, u których wykazano torbiel endometrioidalną z/bez endometriozy otrzewnowej oraz na te, które miały inna torbiel niż endometrialną z/bez endometriozy otrzewnowej. U wszystkich pacjentek oprócz regularnej oceny histopatologicznej opartej o barwienie hematoksyliną i eozyna wykonano barwienia immunohistochemiczne w celu oceny ekspresji receptora FSH (FSH-R) oraz NGF. W celu optymalizacji oceny materiału tkankowego wybarwionego metodami immunohistochemicznymi wykorzystano nowoczesną technikę mikromacierzy tkankowych. Materiał został opracowany w renomowanej pracowni Zakładu Histologii i Embriologii Wrocławskiego Uniwersytetu Medycznego z fachowym wsparciem dr n. med. Christophera Kobierzyckiego. Oceny ekspresji FSH-R i NGF wyrażonej w skali immunoreaktywności (ImmunoReactive Score; IRS) dokonała samodzielnie Doktorantka ze wsparciem i doświadczeniem dr n. med. Marii Szubert. Jest to bardzo cenna i rzadko spotykana we współcześnie przeprowadzanych badaniach klinicznych sytuacja, gdzie lekarz klinicysta samodzielnie sięga po techniki laboratoryjnej oceny. W rozdziale tym Doktorantka szczegółowo opisuje warsztat przygotowania oceny immunohistochemicznej z podaniem dokładnie etapów i warunków procesu oczyszczania materiału tkankowego z zanieczyszczeń i przygotowania go do absorpcji barwników. Jakkolwiek trudno mi osobiście odnieść się do zastosowanych metod laboratoryjnych, to takie podejście odzwierciedla doświadczenie laboratoryjne Autorki pracy oraz daje czytelnikowi poczucie bardzo starannego jej osobistego przygotowania do przeprowadzenia zaplanowanych przez nią, przedstawionych badań. Badanie miało charakter retrospektywny; na badanie

uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej. Rozdział ***Materiały i Metody*** kończy się zwięzłym i przemyślanym opisem zastosowanych metod statystycznych do oceny wyników pracy. Należy podkreślić, że dobór metodyki analizy matematycznej uzyskanych wyników jest trafny.

Efekty swoich badań Doktorantka przedstawiła w formie opisowej w rozdziale ***Wyniki***, który został podzielony na 6 zasadniczych części:

- Charakterystykę badanej populacji – wykazano brak statystycznych różnic pomiędzy grupami.
- Porównanie ekspresji współczynnika immunoreaktywności dla FSH-R. W tym podrozdziale zwraca jedynie pewna nieścisłość w wynikach oceny wg skali IRS, której reguły zostały przedstawione w poprzednim rozdziale na stronie 37. Otóż, w podsumowaniu iloczynu kategorii A i B brakuje cyfry „5” co daje pewien dyskomfort czytelnikowi analizując dane z tego podrozdziału. Ponadto, wg przedstawionej skali IRS na stronie 37 maksymalny, możliwy do uzyskania wynik to liczba 12. Stąd, nie bardzo mogę zorientować się skąd wzięły się maksymalne wyniki immunoreaktywności FSH-R na poziomie 13,42?
- Porównanie ekspresji współczynnika immunoreaktywności dla NGF.
- Korelacje w badanych grupach.
- Analiza wpływu badanych czynników na niepłodność (metoda regresji logistycznej).
- Analiza wpływu FSH-R i NGF na bolesność miesiaczek (metoda regresji logistycznej)

Poza wspomnianymi wyżej uwagami wyniki przedstawione są w sposób czytelny i zrozumiały, który nie budzi zastrzeżeń. Należy podkreślić, że rozdział ten posiada staranne opracowanie graficzne w postaci 12 rycin oraz 22 tabel (4 na końcu pracy jako załącznik).

Obszerne omówienie uzyskanych i przedstawionych wyników znajduje się w rozdziale ***Dyskusja***. Ta część dysertacji zawiera również porównania uzyskanych przez Doktorantkę wyników z doniesieniami innych badaczy. W tej części pracy omówiono również znacznie szerzej problem powstawania bólu w endometriozie. Przedstawiono to ciekawy sposób odnosząc się również do uzyskanych wyników ekspresji ocenianych czynników, co budzi uznanie. Natomiast, Czytelnik dysertacji

doktorskiej opartej o zaawansowane badania kliniczne i laboratoryjne może odczuwać pewien dyskomfort przy stwierdzeniach typu: „mózg jest fascynującym organem” (str. 73), czy dość dogmatycznym założeniu (nie wynikającym z wyników przeprowadzonego badania), że ekspresja NGF jest istotą bólu neuropatycznego w endometriozie (str. 73). Rozumiem, że jest to uniwersalny pogląd, ale w takim przypadku tak mocne stanowisko powinno być poparte co najmniej 1 wiarygodną cytacją. Dalej, stwierdzenie, że: „nie jest rzadkim zjawiskiem rozwinięcie endometriozy po menopauzie” (str. 76) nie odpowiada prawdzie. Owszem, nie jest rzadką sytuacją, że endometrioza utrzymuje się po menopauzie czy nawet jest w jej trakcie rozpoznana, ale jej powstawanie w tym okresie życia kobiety jest z pewnością kazuistyką. Generalnie, z pewnością pewne fragmenty rozważań, które znalazły się w dyskusji (jak np. te dotyczące teorii powstawania endometriozy) spokojnie mogłyby się znaleźć we wstępie do tego opracowania.

Dysertację kończy prezentacja 4 **Wniosków**, które mają wynikać bezpośrednio z przeprowadzonych badań. Autorce udało się wykazać, że:

1. Receptor dla FSH (FSH-R) odgrywa istotną rolę w endometriozie, jego ekspresja w torbielach endometrialnych i endometriozie jest istotnie wyższa niż u pacjentek zdrowych i ten fakt może stanowić podwaliny pod badania nad nowymi lekami w endometriozie.
2. NGF jest ważnym ogniwem w patomechanizmie endometriozy, ekspresja NGF występuje we wszystkich typach endometriozy. Wydaje się, że może odpowiadać za proces bólu przewlekłego w endometriozie, niezależnie od istnienia torbieli w jajniku.
3. Ekspresje badanych receptorów korelują ze sobą, co może oznaczać wzajemny wpływ na tworzenie się nowych połączeń nerwowych i naczyniowych w zmianach endometrialnych.
4. Ani obecność FSH-R w ścianie torbieli jajnika, ani obecność NGF nie wpływa bezpośrednio na bolesność miesiączek u pacjentek z torbielami endometrialnymi, co świadczy o złożonej patogenezie bólu miesiączkowego, niezależnej od istnienia torbieli w jajniku.

Odnosząc się do odpowiedzi we wnioskach na zadane pytania w celach pracy Doktorantce udało się zachować logiczny ciąg w przeprowadzeniu badań i

wyciągnięciu z nich odpowiednich wniosków. Jedynie stwierdzenie we wniosku 2, że ekspresja NGF występuje we wszystkich typach endometriozy wydaje się pewnym nadużyciem w kontekście materiału klinicznego, na którym badanie zostało przeprowadzone. Pacjentki nie były oceniane pod kątem endometriozy głębokiej (DE).

Piśmiennictwo wykorzystane w pracy zawiera 196 pozycje, w większości (185) autorów zagranicznych, co świadczy o niewielkiej jak do tej pory liczbie przeprowadzonych badań w naszym kraju w tym temacie. Niestety, w edycji piśmiennictwa można zauważyć pewien brak staranności edytorskiej, gdyż niektóre pozycje, jak np. 11-ta charakteryzują się odmienną edycją, natomiast pozycja 20-ta zawiera istotne braki bibliograficzne. Rozprawa uzupełniona jest o 2-stronicowe **Streszczenie** w języku polskim i angielskim, w którym Doktorantka dokonuje zwięzłego omówienia założeń, celów, wyników i wniosków swojej pracy.

Podsumowując, stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji dysertacja dotyczy nowatorskiego problemu badawczego, zawiera jasno postawiony cel pracy, demonstruje nowoczesny i profesjonalny warsztat badawczy oraz prawidłowo przedstawia wyniki i wnioski z nich wynikające. Wnioski te, wynikające z pracy mają szansę bezpośrednio w przyszłości wpływać na praktykę kliniczną. Stąd, uważam, że rozprawa lek. Susan Afshari-Stasiak pt.: „Analiza receptora FSH i czynnika NGF w ścianie torbieli endometrialnych jajnika w metodzie mikromacierzy tkankowych” spełnia wszelkie wymogi stawiane pracom na stopień doktora nauk medycznych określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (t.j. Dz. U. Z 2007 r., poz. 1789). W związku z tym mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi wniosek o dopuszczenie lekarki Susan Afshari-Stasiak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Kraków, dn. 15.11.2023 r.

dr hab. n. med. Paweł Basta