

Katowice, dn. 02.02.2024 r.

Prof. dr hab. n. med. Agnieszka Droszol-Cop
Katedra i Oddział Kliniczny Ginekologii, Położnictwa i Ginekologii Onkologicznej
Wydział Nauk o Zdrowiu w Katowicach
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

**RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ NA STOPIEŃ
DOKTORA NAUK MEDYCZNYCH
Mgr Anny Siejki**

**Analiza profilu steroidowego w moczu metodą chromatografii gazowej
sprzężonej ze spektrometrią mas (gc-ms) w diagnostyce zespołu
policystycznych jajników**

**Promotor: dr hab. n. med. Teresa Joanna Stradomska, prof. IPCZD
Zakład Biochemii, Radioimmunologii i Medycyny Doświadczalnej
Instytut „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka”**

Zespół policystycznych jajników (PCOS) jest jedną z najczęściej występujących chorób endokrynologicznych u kobiet i jednocześnie jednym z najbardziej heterogennych zespołów endokrynologicznych o niewyjaśnionej etiologii. Szacuje się, że w zależności od kryteriów diagnostycznych użytych do zdefiniowania, zespół PCOS występuje z częstotliwością 10-20% jako endokrynopatia u kobiet w wieku reprodukcyjnym.

Na obecnym etapie wiedzy, rozpatrywane są trzy główne aspekty pierwotnej przyczyny rozwoju PCOS; gonadotropowy (zaburzenie wydzielania lutropiny LH i folikulotropiny FSH), jajnikowy (zaburzenie produkcji i metabolizmu androgenów w jajniku) oraz insulinozależny (zaburzenie przemian insuliny jako pierwotny patomechanizm etiologiczny). Główne konsekwencje wystąpienia tego schorzenia to zaburzenie funkcji endokrynologiczno - metabolicznych i przede wszystkim funkcji rozrodczych.

PCOS, oprócz problemów z rozrodczością, może prowadzić do poważnych konsekwencji zdrowotnych, takich jak: choroby serca, cukrzyca, rak endometrium czy nadciśnienie tętnicze. Dlatego niezmiernie ważne jest prawidłowe zdiagnozowanie i leczenie PCOS na wczesnym etapie choroby.

Symptomatologia PCOS związana jest z zaburzeniem homeostazy hormonalnej. Nie jest znany szczegółowy patomechanizm tych zaburzeń. Wśród przyczyn powstawania tego zespołu wyróżnia się m.in. uwarunkowania genetyczne, środowiskowe jak również zaburzenia steroidogenezy. W etiopatogenezie zespołu PCOS istotne znaczenie ma zwiększona aktywność cytochromu P450c17 (gen CYP 17), niezbędnego katalizatora syntezy androgenów, który odpowiada za działanie 17-hydroksylazy i 17,20-liazy. Nadmierna produkcja androgenów, zarówno pochodzenia jajnikowego, jak i nadnerczowego, może być efektem zmienionej aktywności enzymatycznej.

Brak jest charakterystycznych biomarkerów chemicznych, które pozwoliłyby na wiarygodną i szybką diagnostykę laboratoryjną tego schorzenia. Często postawienie diagnozy jest bardzo wydłużone w czasie. Brak specyficznych markerów dla diagnostyki oraz dokładnie ustalonej definicji sprawia, że PCOS wciąż stanowi wyzwanie diagnostyczne i jest przedmiotem niesłabnącego zainteresowania naukowców na całym świecie.

Alternatywną techniką analityczną, mogącą zastąpić badanie całego spektrum pojedynczych steroidów w surowicy krwi jest oznaczanie w ramach jednej analizy tzw.

profilu metabolicznego steroidów w moczu przy użyciu metod chromatografii gazowej (GC). Analiza profilowa steroidów obejmuje szereg metabolitów steroidowych, które w zapisie chromatograficznym tworzą typowy obraz dla stanu fizjologicznego lub w charakterystyczny sposób odzwierciedlają dany typ zaburzenia syntezy lub metabolizmu hormonów steroidowych. Powyższa metoda charakteryzuje się dużą niezawodnością, wysoką selektywnością oraz czułością. Do analizy profilu steroidowego stosowane są próbki moczu pochodzące z dobowej zbiórki moczu, dające pełny obraz profilu hormonalnego.

Doktorantka przedstawiła w swojej dysertacji analizę profilu steroidowego w moczu metodą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (gc-ms) w diagnostyce zespołu policystycznych jajników. W pracy został również dokładnie scharakteryzowany cel szczegółowy, jako opracowanie charakterystycznej konfiguracji metabolitów steroidowych, która pozwoli na zastosowanie tych czynników jako biomarkerów chemicznych w diagnostyce zespołu policystycznych jajników na poziomie biochemicznym.

Badania wykonano w ramach Grantu „grant na grant” Nr G –G 2 /2019: „Analiza profilu steroidowego w moczu metodą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS) w diagnostyce zespołu policystycznych jajników”.

Na wyróżnienie zasługuje podjęcie przez Doktorantkę próby opracowania charakterystycznej konfiguracji metabolitów steroidowych (zbadano dokładnie 38 metabolitów: metabolity androgenów, estrogeny, metabolity: mineralokortykoidów, glikokortykoidów oraz androgenów, 17-OH progesteron, estrogeny i ich metabolity) metodą spektrometrii masowej, jako biomarkerów chemicznych w diagnostyce zespołu policystycznych jajników na poziomie biochemicznym.

Dysertacja posiada konstrukcję typową dla prac doktorskich i obejmuje 93 strony, wliczając w to: wstęp, przedstawienie celu pracy i hipotez, opis materiału i metod badań, wyniki, dyskusję, wnioski, 136 pozycji aktualnego, dobrze dobranego piśmiennictwa, spis rycin i tabel, wykaz skrótów i symboli oraz streszczenie w języku polskim i angielskim.

Autorka w części teoretycznej rozprawy (we Wstępie) wyczerpująco przybliży problematykę procesu dojrzewania dziewcząt, zaburzenia cyklu miesięczkowego, fizjologię steroidogenezy, kryteria rozpoznania PCOS, dziedziczenie w zespole policystycznych jajników, obraz kliniczny PCOS, fenotypy PCOS, badania diagnozujące PCOS oraz inne choroby endokrynne prezentujące podobne objawy kliniczne.

Ta część dysertacji stanowi obszerne źródło wiedzy praktycznej, opartej również na bogatym wieloletnim doświadczeniu klinicznym Kliniki Endokrynologii i Diabetologii IPCZD oraz z Kliniki Endokrynologii Ginekologicznej WUM.

Założenia i cele pracy zostały sformułowane jednoznacznie, szczegółowo i przejrzysto.

W rozdziale 8 – Materiał i Metody badań – Doktorantka przedstawiła w sposób niezwykle precyzyjny i dokładny grupy badanych kobiet, kryteria włączenia i wyłączenia z badania, miejsce prowadzenia badań, metodologię badania (zastosowane procedury diagnostyczne - metoda chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas), akceptację Komisji Bioetycznej oraz opis metod statystycznych.

Na przeprowadzenie wszystkich badań uzyskano zgodę od każdego uczestnika projektu.

Pierwszą grupę – kontrolną stanowiło 150 zdrowych kobiet w wieku od 16 do 35 lat. Były to osoby zdrowe, regularnie miesiączkujące, bez cech zaburzeń ginekologiczno-endokrynologicznych, niestosujące antykoncepcji, które wyraziły chęć uczestniczenia w badaniu. Drugą grupę – badaną stanowiło 76 pacjentek z PCOS w wieku od 16 do 35 lat. Do tej grupy rekrutowane były kobiety spośród pacjentek Kliniki Endokrynologii i Diabetologii IPCZD oraz z Kliniki Endokrynologii Ginekologicznej WUM z rozpoznanym zespołem policystycznych jajników według przyjętych kryteriów (Rotterdam ESHRE 2003, AES 2006 i NIH 1990).

U każdej pacjentki wykonano badanie USG miednicy mniejszej.

Do analizy profilu steroidowego stosowane były próbki moczu (50ml) pochodzące z 24-godzinnej dobowej zbiórki moczu (DZM), pobierane w pierwszej fazie cyklu, dające pełny obraz profilu hormonalnego. Następnie oznaczano DHEA-S, testosteron, androstendion, LH, FSH oraz SHBG w surowicy krwi żyłnej pobranej na czczo.

Dokonując recenzji powyższej dysertacji, chciałabym podkreślić, że na wyróżnienie zasługuje fakt bardzo dokładnej charakterystyki zastosowanych metod analitycznych.

Z pozycji Recenzenta sugeruję, aby opisać schemat rekrutacji pacjentek do Grupy I i II. Przed publikacją pracy należałoby również uaktualnić proces diagnostyczny PCOS wg najnowszych wytycznych ESHRE 2023. Zdaję sobie sprawę, że założenia badawcze i prowadzenie badania miało miejsce jeszcze przed opublikowaniem najnowszych wytycznych ESHRE w 2023 roku.

Wyniki badań, przedstawione w rozdziale 9, zostały zaprezentowane w sposób bardzo obszerny, ale zarazem przejrzysty, poparte szczegółową analizą statystyczną oraz licznymi tabelami i rycinami.

Wyniki badań przeprowadzonych w ramach niniejszej rozprawy dowodzą, że istnieje korelacja między obecnością zaburzenia PCOS, a jego statusem metabolicznym. Przeprowadzone badanie wykazuje, że możliwe jest rozpoznanie PCOS na podstawie metabolitów obecnych w moczu na bazie analizy profilu steroidowego w DZM. Znalezienie odpowiednich biomarkerów w profilu steroidowym stanowi istotny krok w kierunku poprawy diagnostyki PCOS na poziomie biochemicznym. Zastosowanie w diagnostyce PCOS analizy profilu steroidowego – wygenerowanego przez Doktorantkę modelu wzorca diagnostycznego - umożliwi odejście od stosowanej obecnie praktyki diagnozy przez wykluczenie oraz przyspieszy proces diagnostyczny i poprawi wiarygodność rozpoznania. To z kolei umożliwi szybsze wprowadzenie właściwego postępowania terapeutycznego i pozwoli uchronić kobiety z grup ryzyka przed rozwojem chorób towarzyszących PCOS.

Doktorantka podkreśla, że jest to pierwsze w świecie opracowanie dobowych wartości referencyjnych dla poszczególnych parametrów profilu steroidowego w moczu, u kobiet w wieku reprodukcyjnym, bazujące na tak licznej grupie badanej (n=150).

W rozdziale Dyskusja Doktorantka przeprowadziła krytyczną analizę uzyskanych przez siebie wyników w szerokim kontekście literatury przedmiotu. Rozdział ten dowodzi dobrej znajomości przez Doktorantkę literatury fachowej w zakresie będącym przedmiotem Jej badań. Wysoko oceniam elementy Dyskusji, w których Doktorantka

przedstawiła potencjalne praktyczne implikacje wyników swoich badań, podkreślając innowacyjność i wymieniając ograniczenia badań własnych. Dowodzi to umiejętności Doktorantki do syntezy uzyskanych wyników oraz krytycznego podejścia do nich przy jednoczesnym zaakcentowaniu przydatności klinicznej tych wyników.

Z pozycji Recenzenta proponowałabym, aby dodatkowo wyodrębnić podrozdział – „Ograniczenia badań własnych”, co istotnie podniosłoby walory rozprawy. Co prawda, Doktorantka w treści Dyskusji podkreśla ograniczenia swoich badań (np. jakość przedziałów referencyjnych badanych biomarkerów), ale należałoby je zebrać w jednym podrozdziale.

Uzyskane wyniki stały się podstawą do wyciągnięcia siedmiu bardzo rozbudowanych wniosków. Wniosek 2, 3 i 5 są praktycznie podsumowaniem wyników badań, więc proponuję pominięcie tych trzech wniosków. Wnioski 1, 4 i 6 są precyzyjne, w pełni wypływające z analizy przedstawionego materiału oraz stanowią rzetelną odpowiedź na postawione cele rozprawy. Ostatni wniosek ma wymiar zarówno kliniczny, jak i praktyczny, stanowiąc właściwe podsumowanie przeprowadzonych badań.

Chciałabym podkreślić, że Doktorantka postawiła sobie jeszcze cel szczegółowy – tzn. opracowanie charakterystycznej konfiguracji metabolitów steroidowych, która pozwoli na zastosowanie jej jako biomarkerów chemicznych w diagnostyce zespołu policystycznych jajników na poziomie biochemicznym. Niestety brakuje wniosku, który wynikałby z powyższego celu szczegółowego. Sugerowałabym, aby go uzupełnić.

Podsumowując, należy podkreślić, iż przedstawiona do recenzji praca stanowi przykład bardzo interesującego i nowatorskiego opracowania naukowego. W swojej pracy Doktorantka udowodniła, iż potrafi dokonać właściwego doboru w szerokim zakresie metod badawczych, pozwalających na prawidłowe rozwiązanie postawionego celu pracy. Wysoko oceniam nie tylko walory naukowe i poznawcze przedstawionej do recenzji dysertacji, ale również wiedzę i umiejętności praktyczne Doktorantki, które w niniejszej pracy zostały ujawnione. Praca napisana jest poprawnym językiem i dobrą polszczyzną, a kilka pomyłek edytorskich nie wpływa w żaden sposób na jakość i wartość merytoryczną

pracy. Wymienione powyżej uwagi nie mają wpływu na ogólną bardzo wysoką ocenę rozprawy doktorskiej mgr Anny Siejki.

Biorąc pod uwagę całość rozprawy doktorskiej, stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska Mgr Anny Siejki „Analiza profilu steroidowego w moczu metodą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (gc-ms) w diagnostyce zespołu policystycznych jajników” spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz.595 z późn. zm.) i tym samym jest podstawą do ubiegania się o stopień naukowy doktora nauk medycznych.

Zwracam się zatem z Wnioskiem do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie o przyjęcie niniejszej rozprawy i dopuszczenie Mgr Anny Siejki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z wyrazami szacunku



Prof. dr hab. n. med. Agnieszka Drosdzol-Cop
SPECJALISTA GINEKOLOG-POŁOŻNIK
GINEKOLOG DZIECIĘCY I DZIEWCZĘCY
SEKSUOLOG
1612566