

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Siejka

*„Analiza profilu steroidowego w moczu metodą chromatografii gazowej
sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS)*

w diagnostyce zespołu policystycznych jajników”

wykonanej w Zakładzie Biochemii, Radioimmunologii i Medycyny

Doświadczalnej Instytut „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka”

Promotor: Dr hab. nauk med. Teresa Stradomska, prof. IPCZD

Zespół policystycznych jajników (*polycystic ovary syndrome, PCOS*) jest najczęściej rozpoznawaną endokrynopatią kobiet w wieku reprodukcyjnym, o nadal nie całkiem poznanej etiologii. Szacuje się, że może nią być obciążonych nawet 20% kobiet w zależności od przyjętych kryteriów rozpoznania. W skład zaburzeń tego Zespołu wchodzi zaburzenia cyklu miesięcznego (przedłużające się lub nieregularne) lub jego braku, hiperandrogenizm a także zaburzenia metaboliczne. W rozpoznaniu najczęściej stosuje się tzw. Kryteria Rotterdamskie (*Rotterdam ESHRE 2003*), gdzie wystarczy obecność przynajmniej dwóch z trzech zaproponowanych objawów rozpoznania PCOS (1. Bezowulacyjne cykle miesiączkowe, 2). Hiperandrogenizm kliniczny i/lub biochemiczny, 3). Obraz policystycznych jajników w USG oraz wykluczenie innych przyczyn androgenizacji. U kobiet z PCOS, zwłaszcza z hiperandrogenizmem biochemicznym, stwierdza się częstsze występowanie zaburzeń metabolicznych, takich jak insulinooporność, zaburzenia gospodarki węglowodanowej, zaburzenia lipidowe, otyłość typu centralnego oraz niealkoholową tłuszczycę wątroby.

W świetle dostępnej, ale wciąż niepełnej wiedzy oraz niewystarczających możliwości szybkiego rozpoznawania PCOS, temat podjęty przez Doktorantkę należy uznać za wysoce interesujący, ważny i aktualny. Warto w tym miejscu zwrócić uwagę, na niespójność kryteriów diagnostycznych PCOS oraz na brak jednoznacznych, charakterystycznych biomarkerów potwierdzających zaburzenie, co łącznie bardzo utrudnia rozpoznanie tego Zespołu. Ponadto, stosowane rozpoznanie poprzez

wykluczenie – znacznie wydłuża proces diagnostyczny i ogranicza możliwość zastosowania szybkiej interwencji terapeutycznej. Stąd też, główny cel rozprawy doktorskiej wychodzi naprzeciw oczekiwaniom związanym z poszukiwaniem specyficznych biomarkerów, które mogą wzbogacić/uzupełnić, ale przede wszystkim przyspieszyć diagnostykę PCOS. W realizacji tak ambitnego celu Doktorantka posłużyła się analizą porównawczą, metabolomiczną i bioinformatyczną profilu steroidowego w próbkach moczu pacjentek z PCOS i odpowiedniej do nich grupy kobiet zdrowych. Profil steroidowy w dobowej zbiorce moczu był badany z wykorzystaniem metody chromatografii gazowej sprzężonej z spektrometrią masową (GC-MS).

Autorka rozpoczęła dysertację doktorską od ciekawego wstępu, omawiającego procesy fizjologiczne okresu dojrzewania kobiet, fizjologię steroidogenezy. Następnie płynnie przeszła do omawiania zespołu PCOS, uwzględniając obraz kliniczny oraz fenotypy tego zaburzenia na tle innych endokrynopatii o podobnych objawach klinicznych. Doktorantka, nie pominęła omówienia najnowszych wytycznych z 2018 roku, dotyczących diagnozowania i leczenia PCOS. Odnosząc się do zalecanych metod oceny biochemicznego hiperandrogenizmu Doktorantka zaproponowała jako alternatywę badanie profilu steroidowego w miejsce rekomendowanych oznaczeń stężenia wolnego testosteronu, wyliczania biodostępnego testosteronu lub indeksu wolnych androgenów.

Dysertacja mgr Anny Siejka ma typowy układ pracy doktorskiej. Jest pracą metodyczną stąd też wiele miejsca poświęciła na opracowanie zastosowanych w rozprawie metod badawczych. Omówiła metody analizy biochemicznej: metodę chromatografii gazowej sprzężonej z spektrometrią masową (GC-MS), metody elektro- oraz chemiluminescencji (ECLIA oraz CLIA). Kluczowym elementem pracy jest analiza profilu steroidowego, z omówieniem preparatyki chemicznej profili steroidowych, ocenianych w dobowej zbiorce moczu oraz warunków analizy chromatograficznej i identyfikacji hormonów steroidowych metodą spektrometrii masowej.

Badania recenzowanej rozprawy doktorskiej zostały finalnie przeprowadzone w 226-osobowej grupie pacjentek, w tym u 76 pacjentek z PCOS wg obecnie przyjętych kryteriów diagnostycznych, będących pacjentkami Kliniki Endokrynologii i Diabetologii IPCZD oraz Kliniki Endokrynologii Ginekologicznej WUM. Grupę odniesienia – stanowiło 150 kobiet zdrowych, regularnie miesiączkujących, bez cech zaburzeń ginekologiczno-endokrynologicznych i nie stosujących hormonalnej

antykoncepcji. W badaniu klasyfikacyjnym pacjentek z PCOS, z wyłonieniem poszczególnych fenotypów PCOS wykonano oznaczenia w surowicy krwi stężeń androgenów (testosteronu, androstendionu, siarczanu dehydroepiandrosteronu, gonadotropin (hormonu luteinizującego oraz folikulotropowego), 17-hydroksyprogesteronu oraz białka wiążącego hormony płciowe.

Cel rozprawy doktorskiej Autorka realizowała w dwóch etapach badawczych. Pierwszym etapem była weryfikacja i ustalenie zakresów referencyjnych dla poszczególnych metabolitów steroidowych w dobowej zbiorce moczu na podstawie analiz wykonanych w 150 osobowej grupie kobiet zdrowych. Drugim zaś celem badawczym była analiza porównawcza metabolomiczna oraz bioinformatyczna profili steroidowych w moczu kobiet zdrowych oraz obciążonych zespołem PCOS. Ten pierwszy etap, niezwykle istotny i warty podkreślenia, zaowocował doniesieniem przedstawianym na Kongresie *Euro Med. Lab* w Rzymie w 2023 roku. W badaniach drugiego etapu, na podstawie przeprowadzonych analiz Autorka wykazała, że w przebiegu zespołu PCOS dochodzi do zmian w wydalaniu metabolitów steroidowych w moczu. Udało się zidentyfikować 38 związków steroidowych, których stężenia korelowały z występowaniem PCOS. Spośród tych 38 steroidów istotne statystycznie różnice zostały wykazane dla 10 z nich. W efekcie dalszych analiz klasyfikacyjnych Autorka przedstawiła profil predykcyjny składający się z czterech steroli: 5-Androstendiol (5AND), 16-hydroksy-dehydroepiandrosteron (16-OHDHA), 5-Pregnenetriol (5-PT) oraz Pregnanetriol (PT). Profil ten poprawnie klasyfikuje 97.8% przypadków PCOS niezależnie od fenotypu choroby. Przeprowadzona kolejna analiza dyskryminacyjna nie potwierdziła zdolności różnicowania między poszczególnymi fenotypami PCOS.

W przeprowadzonych analizach porównawczych: metabolomicznej oraz bioinformatycznej profili steroidowych w moczu kobiet obydwu grup badawczych zabrakło jednak klinicznej charakterystyki poszczególnych składników, jak i całościowego zaproponowanego profilu steroidowego. Autorka nie przedstawiła tak istotnych parametrów oceny każdego testu diagnostycznego jak: czułość i swoistość a także wartości predykcyjnej wyniku dodatniego i ujemnego. Istotnym elementem oceny przydatności klinicznej testu powinna być także analiza krzywych ROC (*Receiver Operator Characteristic Curve*), na podstawie której można wyznaczyć optymalny diagnostyczny punkt odcięcia przy maksymalnej sumie swoistości i czułości testu.

W moim odczuciu, uboga jest również charakterystyka demograficzna obu grup badanych, a szczególnie pacjentek z PCOS. Zabrakło charakterystyki klinicznej obejmującej chociażby ocenę funkcji nerek, wątroby czy statusu glikemii/insulinooporności. Wzbogaciłoby to pracę a jednocześnie umożliwiło określenie ewentualnych zależności pomiędzy parametrami klinicznymi a profilem steroidowym, szczególnie pacjentek z PCOS.

W podsumowaniu, pragnę mocno podkreślić, że Doktorantka przedstawiła pierwsze w świecie opracowanie, bardzo dobrze udokumentowanych wartości referencyjnych dla poszczególnych parametrów profilu steroidowego w dobowej zbiorce moczu, u kobiet w wieku rozrodczym, w oparciu o tak liczną 150 osobową grupę kobiet zdrowych. Ponadto, istotnym elementem nowości jest propozycja badań globalnego wydzielania steroidów w moczu. Dzięki temu unika się inwazyjnego pobierania krwi a także eliminuje błędy klasycznych oznaczeń immunochemicznych w surowicy krwi. Ma to szczególne znaczenie w przypadku badań hormonalnych, bowiem są one często związane ze zwiększoną wątrobową syntezą białek wiążących co skutkuje uzyskiwaniem wyników fałszywie negatywnych. Wybór moczu jako materiału do badań a także zastosowanie metodyki chromatografii gazowej sprzężonej z MS prowadzi do uzyskiwania precyzyjnych i wiarygodnych wyników.

Kończąc, pragnę mocno podkreślić, że sformułowane przeze mnie drobne uwagi i sugestie nie podważają wysokiej, merytorycznej wartości przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej. Praca ta reprezentuje nie tylko wysoki i cenny walor praktyczny, ale także stanowi istotny element nowości naukowej. Analiza profilowa steroidów w moczu, obejmująca szereg metabolitów znacznie precyzyjniej odzwierciedla stan fizjologiczny oraz specyficzne zaburzenia syntezy bądź metabolizmu hormonów steroidowych.

Podsumowując uważam, że rozprawa doktorska mgr Anny Siejka spełnia warunki stawiane rozprawom 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 (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). Mam zaszczyt i przyjemność zwrócić się do Wysokiej Rady Nauk Medycznych Instytutu „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie z wnioskiem o dopuszczenie mgr Anny Siejka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Warszawa, 08.02.2024

str. 4

WARSZAWSKI
UNIWERSYTET MEDYCZNY
Wydział Farmaceutyczny

prof. dr hab. Grażyna Sygbitowicz