

Szczecin, dnia 2 marca 2022 roku

Dr hab. Hanna Kulig, prof. ZUT

Katedra Genetyki

Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Małgorzaty Rychlickiej

pt. *„Ocena waspiny jako czynnika diagnostycznego i prognostycznego u pacjentek z rakiem endometrium”*

wykonanej pod kierunkiem naukowym
dr hab. n. med. Anety Cymbaluk-Płoskiej

OCENA PODJĘTEGO PROBLEMU BADAWCZEGO

Według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) w 2020 roku rak odpowiadał za prawie 1 na 6 zgonów. Sytuację tę można polepszyć poprzez wczesną diagnozę i natychmiastowe podjęcie leczenia. Stąd nieustannie trwają prace eksperymentalne i kliniczne mające na celu doskonalenie metod terapii nowotworów, a także poprawę jakości życia pacjentów onkologicznych poprzez wczesną i precyzyjną diagnozę oraz prognozowanie.

Poznano już wiele markerów nowotworowych, przy czym niektóre z nich są związane tylko z jednym rodzajem raka, inne z więcej niż jednym. Niemniej wciąż trwają prace nad poszukiwaniem i opracowywaniem nowych biomarkerów diagnostycznych i prognostycznych, w tym na poziomie genomu, transkryptomu, epigenomu, proteomu, czy metabolomu. Przeprowadzone przez Doktorantkę badania wpisują się zatem w aktualny trend badawczy z tego zakresu.

OCENA FORMALNA I EDYTORSKA

Przedstawiona do oceny praca doktorska stanowi opracowanie liczące 131 stron maszynopisu. Praca została przygotowana zgodnie z zasadami obowiązującymi dla tego typu prac i podzielona na 8 rozdziałów: Wstęp (z 13 podrozdziałami), Cele pracy (z 2 podrozdziałami), Materiał i metody (z 3

podrozdziałami), Wyniki badań (z 14 podrozdziałami), Dyskusja, Wnioski, Bibliografia, Spis tabel i rycin.

Rozdziały pracy poprzedzone są Spisem oznaczeń i skrótów, co jest pomocne w trakcie lektury. Wymaga on jednak weryfikacji pod względem kompletności (brakuje niektórych skrótów, np. PR, PCOS, SFRP5, TLR459, EGRF, ERK, HDL, POMC, GRP78, VDAC), poprawności rozwinięcia i/lub tłumaczenia (PTEN, ER, CTRP, mTOR, COX2) oraz uzupełnienia tłumaczenia (KRAS, TP53, ARID1A).

Cytowane piśmiennictwo liczące 113 pozycji i odpowiednio dobrane do poruszanego zagadnienia badawczego, w całości stanowią prace anglojęzyczne z uznanych czasopism naukowych. Warto podkreślić, że Autorka w znacznej mierze odnosi się do najnowszych osiągnięć, ponieważ ok. połowa cytowanych prac opublikowana została w ciągu ostatnich 10 lat. Każda z pozycji znajduje odniesienie w tekście.

Bogaty materiał graficzny w postaci 19 rycin oraz 33 tabel z danymi liczbowymi został przyporządkowany do właściwych rozdziałów/podrozdziałów, co stanowi dla czytelnika duże ułatwienie w analizie uzyskanych wyników. Jednak nie wszystkie ryciny i tabele znajdują odniesienie w tekście. Ponadto w treści manuskryptu widnieje 19 rycin, a w spisie 18, przy czym nieujęta w spisie rycina nie została zatytułowana. Pozostałe uwagi do materiału graficznego zostały przedstawione w dalszej części recenzji.

Pracę napisano poprawnym językiem naukowym, choć niektóre użyte określenia wymagają korekty. W trakcie lektury można również napotkać uchybienia stylistyczne, interpunkcyjne oraz literowe, a także tzw. skróty myślowe. Przy dokonanej przez Autorkę tak szczegółowej analizie nie udało się również uniknąć powtórzenia niektórych informacji w różnych częściach niektórych rozdziałów. Powyższe uwagi zostały zaznaczone w treści manuskryptu.

OCENA MERYTORYCZNA

Treść pracy w pełni odpowiada tematowi zawartemu w tytule. Wybór tematu świadczy o zorientowaniu Doktorantki w ważnej i ciągle aktualnej problematyce z zakresu ginekologii onkologicznej.

W rozdziale **Wstęp** Autorka przybliży czytelnikowi w sposób syntetyczny zagadnienia związane z rakiem *endometrium*, w tym epidemiologię, fizjologię, typy histopatologiczne, czynniki ryzyka oraz potencjalne czynniki ochronne. Sporo uwagi zostało poświęcone otyłości, która stanowi jeden z najistotniejszych czynników ryzyka raka *endometrium*. Opisuując następnie tkankę tłuszczową w kontekście źródła aktywnych biologicznie substancji, Doktorantka przechodzi do podrozdziału

poświęconego tytułowej waspinie – adipokinie, której synteza ma miejsce w tejże tkance. Tym samym czytelnik zostaje wprowadzony w problematykę podjętych badań z uzasadnieniem potrzeby ich wykonania. W moim odczuciu podrozdział zatytułowany Waspina mógłby znaleźć się bezpośrednio przed kolejnym rozdziałem Cele pracy, co zapewniłoby płynne przejście od problemu do celu.

W rozdziale **Cele pracy** znalazł się cel główny oraz pięć celów szczegółowych, które uważam za odpowiednio sformułowane i stanowiące następstwo omówionego we wstępie problemu badawczego.

W rozdziale **Materiał i metody** Autorka przedstawiła materiał badawczy oraz założenia metodyczne wykonanych analiz. Badaniami objęto 127 pacjentek Kliniki Ginekologii Operacyjnej i Onkologii Ginekologicznej Dorosłych i Dziewcząt Samodzielnego Publicznego Szpitala Klinicznego nr 2 PUM w Szczecinie, charakteryzujących się nieprawidłowymi krwawieniami z jamy macicy. Ustalono grupę kontrolną z dwiema podgrupami (30 pacjentek z polipami endometrium i 32 pacjentki z mięśniakami macicy) oraz grupę badaną, do której zakwalifikowano 65 pacjentek z rozpoznanym rakiem *endometrium*. Ponadto pacjentki zostały podzielone na grupy ze względu na: typ raka *endometrium*, wartości BMI, obwód w talii, wskaźnik talia:biodro, poziom glikemii na czczo, a także ze względu na obecność lub brak takich czynników ryzyka jak nadciśnienie tętnicze, cukrzyca typu 2, choroby tarczycy. Dokonano również podziału pacjentek ze względu na status hormonalny oraz stosowanie lub niestosowanie hormonalnej terapii zastępczej. Na podstawie wyników badań histopatologicznych ustalono grupy pacjentek wg stopnia dojrzałości nowotworu, stadium zaawansowania, grubości naciekania mięśniówki, obecności lub braku przerzutów do węzłów chłonnych oraz przestrzeni limfatycznej, a także obecności lub braku angioinwazji. Oznaczono również stężenie waspiny w surowicy krwi pacjentek stosując immunoenzymatyczną metodę ELISA, a także dokonano analizy immunohistochemicznej waspiny w materiale pooperacyjnym. W ostatniej części rozdziału opisano analizę statystyczną uzyskanych wyników, do realizacji której posłużono się oprogramowaniem Statistica.

Uważam, że część doświadczalną prawidłowo zaplanowano, zorganizowano i przeprowadzono, wykorzystując odpowiedni materiał oraz metody badawcze. Świadczy to o znajomości warsztatu pracy niezbędnego do zrealizowania postawionego problemu badawczego. Pragnę jednak zwrócić uwagę na drobne nieścisłości. Niektóre wartości liczbowe są wspólne dla dwóch grup pacjentek lub nieprzyporządkowane do danej grupy, m.in. obwód w talii = 100 cm, glikemia na czczo = 110 mg/dL oraz wskaźnik talia / biodro = 0,8 nie zostały zakwalifikowane do żadnej z grup, natomiast wartość wskaźnika BMI = 25 kg/m² została włączona do dwóch grup. Sugeruję również rozważenie

zastosowania powszechnie używanej jednostki poziomu glukozy w osoczu krwi na czczo (mg/dL). Powyższe uwagi odnoszą się również do rozdziału Wyniki.

Rozdział **Wyniki** jest szczegółowym opisem uzyskanych rezultatów badań. Doktorantka przedstawia kolejno charakterystykę badanej grupy pacjentek w oparciu o dane z wywiadu, przechodząc następnie do wyników oceny stężenia waspiny w surowicy krwi w zależności od czynników ryzyka raka *endometrium* oraz od rozpoznania histopatologicznego. Dokonana została także analiza stężenia waspiny u pacjentek z rakiem *endometrium* w momencie diagnostyki i przed leczeniem operacyjnym, jak również w odniesieniu do uznanych czynników rokowniczych. Doktorantka dokonała w dalszym etapie oceny waspiny jako czynnika ryzyka oraz potencjalnego markera diagnostycznego raka *endometrium*.

Doktorantka zaobserwowała statystycznie istotne różnice w odsetku rozpoznania histopatologicznego w odniesieniu do wykształcenia, miejsca zamieszkania, statusu hormonalnego, nadciśnienia tętniczego, występowania chorób tarczycy, wskaźnika BMI i obwodu w talii. Autorka wykazała również statystycznie istotne różnice w stężeniu waspiny w surowicy krwi między grupami pacjentek z różnym wskaźnikiem BMI oraz różnym obwodem w talii, a także między grupą badaną i kontrolną. Stężenie waspiny okazało się także istotnie różne między pacjentkami z niskim i wysokim stopniem zaawansowania oraz zróżnicowania nowotworu. Ponadto pacjentki z zajęciem przestrzeni limfatycznych i obecnością przerzutów w węzłach chłonnych charakteryzowały się istotnie niższym stężeniem waspiny w surowicy krwi w porównaniu z pacjentkami wolnymi od tych cech. Na podkreślenie zasługuje wykazanie przez Doktorantkę potencjalnej przydatności pomiaru stężenia waspiny w surowicy krwi jako testu różnicującego zmiany łagodne od raka *endometrium*. Uzyskane wyniki sugerują możliwość rozpatrywania waspiny jako markera diagnostycznego u pacjentek z nieprawidłowymi krwawieniami. Autorka wykazała także przydatność pomiaru stężenia waspiny do określania stopnia zaawansowania klinicznego (staging) raka *endometrium* oraz do przewidywania pacjentek z grupy wysokiego ryzyka wznowy. Jednak słusznie zasugerowała konieczność dalszych badań, które mogłyby potwierdzić diagnostyczną i prognostyczną rolę waspiny w tym zakresie.

Uzyskane przez Doktorantkę wyniki uważam za interesujące, wartościowe i charakteryzujące się dużym potencjałem aplikacyjnym. Jednak, w mojej ocenie, pewne elementy wymagają dopracowania lub doprecyzowania.

- Należałoby zweryfikować i doprecyzować niefortunne określenia oraz skróty myślowe (np. „odsetek procentowy”, „Różnica pomiędzy surowiczymi stężeniami wynosiła $p=0.004$ ” str. 56, „nie wykazano poziomu istotności statystycznej” str. 89 i 90, „nie stwierdzono różnic” w podsumowaniu wyników dotyczących charakterystyki badanej grupy pacjentek).

- W prezentowanych wartościach liczbowych części dziesiętne, setne i tysięczne powinny być poprzedzone przecinkiem, a nie kropką.
- W treści rozdziału oraz w materiale graficznym zabrakło jednostki miary dla obwodu talii (WC, cm).
- W opisie tabeli 17 wydaje się zasadne doprecyzowanie określenia „grupa kontrolna” jako grupa skupiająca zarówno pacjentki z polipami *endometrium*, jak również z mięśniakami macicy.
- Tytuł podrozdziału „Ocena zależności w stężeniach surowiczych waspiny u pacjentek z rakiem *endometrium* w momencie pobrań” należałoby uzupełnić określeniem „oraz przed leczeniem operacyjnym”. Podobnie można by doprecyzować tytuły rycin 13. i 14. poprzez dodanie słów „raka *endometrium*”, a tytuł tabeli 18 rozwinąć.
- W opisie wyników dotyczących ekspresji waspiny Autorka odwołuje się do ryciny 16., a w mojej ocenie powinna to być tabela 18.
- Uważam, że podanie liczebności grup pacjentek w poszczególnych tabelach oraz dodanie legendy mogłoby ułatwić czytelnikowi analizę zamieszczonych tam danych bez konieczności doczytywania informacji w tekście.
- Rozdzielenie grup pacjentek poziomem istotności w tabelach 1,2,3,8 może sugerować, że analiza była dokonana tylko między wybranymi grupami. Pomocne mogłoby być użycie gwiazdek przy wartościach różniących się istotnie statystycznie. Poprzez zastosowanie takiego oznaczenia można by rozważyć także stworzenie po jednej tabeli dla danych umieszczonych w tabelach 10-12, 18-20 oraz 23-25. Takie zaprezentowanie uzyskanych wyników ułatwiłoby czytelnikowi ich całościową analizę.

W rozdziale **Dyskusja** Doktorantka dokonuje porównania wyników swoich badań z wynikami uzyskanymi przez inne zespoły badawcze, przy czym analiza jest wnikliwa i szczegółowa, a proponowana interpretacja dobrze przemyślana. Autorka opiera się na danych z odpowiednio dobranych pozycji piśmiennictwa, co świadczy o dobrej znajomości literatury z zakresu realizowanych badań.

W rozdziale **Wnioski** Autorka przedstawiła pięć wniosków sformułowanych na podstawie uzyskanych wyników. Wskazują one jasno, że postawione cele zostały zrealizowane. W moim odczuciu wniosek trzeci mógłby być rozdzielony na dwa wnioski, a wniosek drugi wydaje się bardziej stwierdzeniem.

PODSUMOWANIE

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska wpisuje się w aktualny nurt badań nad poszukiwaniem i opracowaniem nowych markerów znajdujących zastosowanie w praktyce z zakresu ginekologii onkologicznej. Podjęty problem badawczy ma znaczenie zarówno poznawcze, jak również aplikacyjne. Stwierdzam, że postawione przez Doktorantkę cele pracy zostały zrealizowane poprzez zastosowanie właściwie dobranej materiału i metod badawczych. Uzyskane wyniki zostały wnikliwie opisane i skonfrontowane z tematycznym piśmiennictwem naukowym. Pragnę podkreślić, że wskazane uwagi nie umniejszają wartości merytorycznej pracy, natomiast mogą stać się pomocne przy opracowywaniu wyników badań do opublikowania.

Uważam, że rozprawa doktorska mgr Małgorzaty Rychlickiej pt. "Ocena waspiny jako czynnika diagnostycznego i prognostycznego u pacjentek z rakiem endometrium" spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami) i wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Medyczne Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie o dopuszczenie mgr Małgorzaty Rychlickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

