

Ocena rozprawy doktorskiej
mgr inż. Karoliny Magdaleny Soroczyńskiej
pt. „Significance of the molecular profile of extracellular vesicles from plasma and peritoneal
fluid in the development of endometriosis”

Promotor: dr hab. n. med. i n. o zdr. Małgorzata Czystowska-Kuźmicz

Rada Dyscypliny Nauk Medycznych

Warszawski Uniwersytet Medyczny

Endometrioza pozostaje jednym z nierozwiązanych zagadnień współczesnej ginekologii. Jest chorobą częstą, przewlekłą i niejednorodną, a jej rozpoznanie nadal bywa stawiane z wieloletnim opóźnieniem. Z punktu widzenia klinicysty szczególnie dotkliwy jest brak prostego, wiarygodnego i możliwego do powtarzania testu, który mógłby wspierać rozpoznanie czy ocenę aktywności choroby jak również monitorowanie leczenia.

Intensywne badania nad poszukiwaniem potencjalnych markerów endometriozy obejmują ocenę pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (Extra cellular Vesicles). Mogą one być nośnikiem informacji o lokalnych i ogólnoustrojowych procesach towarzyszących endometriozie. Ich wybór jako przedmiot badań należy uznać za trafny i aktualny, co zostało przez Doktorantkę dobrze uzasadnione w początkowej części monografii.

Podjęcie tematu wymagało przekrojowych umiejętności i wiedzy z zakresu biologii rozrodu, immunologii, biochemii, proteomiki, bioinformatyki, a także technologii analizy pojedynczych pęcherzyków. Już sam zakres pracy pokazuje, że Doktorantka podjęła zadanie ambitne i wymagające metodologicznie uzyskując na nie finansowanie z Grantu dla młodych naukowców WUM, z grantu NCN OPUS oraz wsparcie z programów Narodowej Agencji Wymiany Akademickiej NAWA jak również programów partnerstwa między narodowej

Przedstawiona do recenzji rozprawa ma formę obszernej monografii przygotowanej w języku angielskim. Obejmuje 161 numerowanych stron, 35 rycin, 6 tabel oraz 234 pozycje piśmiennictwa. Zawiera streszczenie w języku angielskim i polskim, wykaz skrótów, szczegółowy opis materiału i metod, rozbudowaną część wynikową, dyskusję, wnioski oraz dokumentację zgody komisji bioetycznej. Układ pracy jest przejrzysty i prowadzi czytelnika od klinicznego problemu endometriozy, poprzez biologiczne podstawy funkcjonowania

pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, aż do zaawansowanych analiz proteomicznych i obrazowej cytometrii przepływowej. Rozprawa jest bogato ilustrowana, a wysokiej jakości ryciny przedstawiające schematy patofizjologiczne, profile proteomiczne, sieci interakcji białkowych i wyniki analiz wzbogacenia szlaków w istotny sposób ułatwiają odbiór złożonego materiału.

Część wstępna jest szeroka i dobrze osadza projekt w aktualnym kontekście naukowym. Doktorantka omawia kliniczne znaczenie endometriozy, jej wpływ na płodność i jakość życia, najważniejsze koncepcje patofizjologiczne, zaburzenia odpowiedzi immunologicznej, przebudowę macierzy zewnątrzkomórkowej, angiogenezę i neuroangiogenezę. Następnie logicznie przechodzi do biologii pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, ich biogenezy, składu molekularnego, funkcji w komunikacji międzykomórkowej oraz możliwości wykorzystania ich jako elementu płynnej biopsji. Doceniam zwłaszcza próbę przedstawienia EV nie jako biernego materiału analitycznego, lecz jako potencjalnych uczestników procesu chorobowego. Wstęp omawia szereg aspektów biologii EV, w tym odnoszące się do procesów zapalnych, adhezji, angiogenezy i przebudowy tkanek, stanowi on odpowiednie i kompletne przygotowanie do części doświadczalnej.

Założenia pracy i jej cele zostały sformułowane jasno. Głównym celem było scharakteryzowanie i porównanie profili proteomicznych EV izolowanych z płynu otrzewnowego i osocza pacjentek z endometriozą oraz kobiet bez widocznych zmian endometriotycznych, a następnie ocena, w jakim stopniu profile te odzwierciedlają lokalne i systemowe mechanizmy choroby. Cele szczegółowe obejmowały izolację i kompleksową charakterystykę EV, identyfikację białek różniących grupy, porównanie obu przedziałów biologicznych, analizę szlaków i sieci funkcjonalnych, wskazanie wspólnego zestawu białek oraz wstępną ocenę potencjału translacyjnego z wykorzystaniem cytometrii obrazowej. Cele są ze sobą spójne i odpowiadają przedstawionemu planowi badań.

Materiał kliniczny pochodził z wieloośrodkowego badania prowadzonego w ośmiu klinikach położnictwa i ginekologii w Polsce. Pobieranie i przetwarzanie materiału biologicznego realizowano według standardów EPHeCT, czas od pobrania do zabezpieczenia próbek był kontrolowany, a rozpoznanie endometriozy potwierdzano chirurgicznie i histologicznie. Do zasadniczej analizy proteomicznej włączono materiał od 26 kobiet: 10 pacjentek z endometriozą w stopniu III-IV według rASRM oraz 16 kobiet bez widocznych ognisk choroby podczas laparoskopii. Od każdej uczestniczki analizowano zarówno osocze, jak i płyn otrzewnowy, co stanowi istotny atut projektu, ponieważ umożliwia bezpośrednie zestawienie przedziału lokalnego i systemowego. Korzystne jest również ograniczenie analizy

do fazy proliferacyjnej cyklu, co zmniejsza ryzyko, że obserwowane różnice wynikają wyłącznie z fizjologicznej zmienności hormonalnej.

Dobór grupy z zaawansowaną endometriozą jest zrozumiały w badaniu, w którym poszukuje się możliwie wyraźnego sygnału biologicznego. Jednocześnie ogranicza on możliwość przeniesienia wniosków na pacjentki z chorobą minimalną, łagodną lub powierzchowną - a więc właśnie na populację, w której potrzeba nieinwazyjnego testu diagnostycznego jest największa. W grupie badanej znalazła się ponadto tylko jedna pacjentka w stopniu IV, podczas gdy pozostałe miały stopień III. Jej profil wyraźnie odróżniał się na mapach cieplnych zarówno w płynie otrzewnowym, jak i w osoczu. Jest to obserwacja interesująca, lecz na podstawie pojedynczego przypadku nie można jeszcze wnioskować o związku profilu EV ze stopniem zaawansowania choroby. W rozprawie zaznaczono to ograniczenie, co oceniam pozytywnie.

Zakres zastosowanych metod jest przekrojowy i szeroki. EV izolowano metodą chromatografii wykluczania wielkościowego, a ich charakterystykę przeprowadzono z użyciem klasycznej i fluorescencyjnej analizy śledzenia nanocząstek, oznaczenia stężenia białka, Western blottingu oraz kriomikroskopii elektronowej. Następnie zastosowano ilościową proteomikę opartą na znakowaniu TMT i spektrometrii mas wysokiej rozdzielczości, a uzyskane dane poddano wieloetapowej analizie bioinformatycznej obejmującej między innymi PCA, grupowanie hierarchiczne, Gene Ontology, KEGG, Reactome oraz sieci STRING. Wybrane markery oceniono następnie na poziomie pojedynczych pęcherzyków z wykorzystaniem obrazowej cytometrii przepływowowej. Takie zestawienie metod jest jedną z głównych wartości pracy. Na uznanie zasługuje świadome odniesienie procedury izolacji i charakterystyki EV do zaleceń MISEV2023. Doktorantka wykazała obecność typowych markerów EV, potwierdziła brak kalneksyny w izolatach i przedstawiła obraz błony lipidowej w kriomikroskopii.

Opis przygotowania próbek do proteomiki jest szczegółowy i pozwala odtworzyć etapy eksperymentu. Zastosowanie TMT, frakcjonowania przy wysokim pH oraz aparatu Orbitrap Exploris 480 umożliwiło uzyskanie bardzo dużej głębokości proteomicznej. Włączenie kanałów referencyjnych z proteomów komórkowych oraz EV pochodzących z linii 12Z i MDAH-2774 miało zwiększyć możliwość identyfikacji białek mniej typowych dla osocza. Jest to interesujące rozwiązanie, ale wymaga bardzo precyzyjnego uzasadnienia. Obecność białek z linii endometriotycznej i nowotworowej może poszerzać przestrzeń identyfikacji, lecz jednocześnie może kierować wykrywanie w stronę białek charakterystycznych dla tych modeli. Ponadto w dyskusji pojawia się opis „endometriosis-derived and healthy decidualized

endometrial stromal cell lines”, który nie odpowiada liniom przedstawionym w części metodycznej.

Osocze i płyn otrzewnowy pochodziły od tych samych kobiet, a próbki były zbierane wieloosrodkowo. Warto zatem jasno wyjaśnić, czy w analizach porównujących przedziały biologiczne lub wspólne sygnatury wykorzystano informację o sparowaniu oraz czy oceniano potencjalny wpływ ośrodka, wieku, wskazania do laparoskopii i innych zmiennych klinicznych. Doktorantka prawidłowo zwraca uwagę na ograniczoną liczebność grup i ryzyko utraty sygnałów po korekcji wielokrotnych porównań, jednak właśnie dlatego przejrzyste oddzielenie wyników eksploracyjnych opartych na surowym p od wyników utrzymujących istotność po FDR ma zasadnicze znaczenie.

Część wynikowa jest rozbudowana i bardzo dobrze udokumentowana. W EV z osocza zidentyfikowano 2600 białek, natomiast w EV z płynu otrzewnowego 3571 białek; 2304 białka były obecne w obu przedziałach. Jest to bardzo szeroki profil, zwłaszcza jak na materiał osoczowy. Analiza PCA oraz grupowanie hierarchiczne wykazały wyraźniejszy rozdział grup w przypadku EV z płynu otrzewnowego, co jest biologicznie wiarygodne, ponieważ płyn otrzewnowy pozostaje w bezpośrednim kontakcie z ogniskami choroby i lokalnym środowiskiem immunologicznym. Profil osoczowy był słabszy i bardziej zmienny, ale nadal wskazywał na obecność sygnałów związanych z endometriozą. W płynie otrzewnowym różnicujące białka wiązały się głównie z odpowiedzią wrodzoną, aktywacją neutrofili, metabolizmem żelaza, stresem oksydacyjnym, ferroptozą, adhezją oraz przebudową macierzy zewnątrzkomórkowej. Doktorantka zwróciła uwagę między innymi na HIC2, MPHOSPH10, MUC5AC, FAT3, DNMT1 oraz białka rodziny S100. Szczególnie ciekawa jest integracja sygnałów zapalnych i żelazozależnych z procesami włóknienia i inwazji, ponieważ dobrze odpowiada ona biologii zaawansowanej endometriozy. Trzeba jednak zachować ostrożność przy przypisywaniu funkcji białkom, których rola w endometriozie nie została dotąd potwierdzona. W przypadku HIC2 czy MPHOSPH10 uzyskane dane są przede wszystkim przesłanką do dalszych badań, a nie dowodem ich mechanistycznego udziału w rozwoju zmian. W osoczu najbardziej wyróżniały się białka związane z transportem pęcherzykowym, adhezją, sygnalizacją, odpowiedzią immunologiczną i przebudową nabłonka. Do szczególnie interesujących należały PIK3C2A, SDC4, MUC16 i S100A12. Z punktu widzenia dalszego rozwoju biomarkera właśnie osocze ma największe znaczenie praktyczne, ponieważ jego pobranie jest mało inwazyjne i może być powtarzane. Płyn otrzewnowy ma natomiast przede wszystkim wartość mechanistyczną i referencyjną, gdyż jego uzyskanie wymaga zabiegu. Najciekawszą częścią projektu jest zatem próba identyfikacji białek obecnych w obu

przedziałach, które mogłyby łączyć lokalną aktywność choroby z sygnałem dostępnym w krążeniu. W pracy wyodrębniono 24 takie białka, obejmujące między innymi rodzinę S100, SDC4, VCAN oraz kolageny typu I.

Integracja proteomiki z IFCM jest wartościowa i dobrze przemyślana. W płynie otrzewnowym potwierdzono różnice w zakresie HLA-DR, a w osoczu uzyskano zgodność dla CD81 i MUC1/CD227. W odrębnej kohorcie okołoperacyjnej zaobserwowano zmniejszenie liczby pęcherzyków dodatnich dla wielu markerów już 48 godzin po usunięciu zmian, bez równoległego spadku całkowitej liczby cząstek. Wynik ten pokazuje czułość metody na dynamiczne zmiany fenotypu EV, ale jego interpretacja biologiczna powinna pozostać ostrożna. Okres 48 godzin po laparoskopii obejmuje wpływ urazu operacyjnego, znieczulenia, zmian objętości płynów, aktywacji płytek, odpowiedzi ostrej fazy i leków okołoperacyjnych. Nie można zatem jednoznacznie przypisać obserwowanego spadku wyłącznie redukcji obciążenia chorobą. Jest to jednak bardzo dobry wynik typu proof-of-principle, który uzasadnia badania w późniejszych, lepiej kontrolowanych punktach czasowych.

W części dotyczącej IFCM zastosowano liczne kontrole techniczne, w tym próbki bez barwienia, kontrole samych przeciwciał, seryjne rozcieńczenia ograniczające zjawisko swarm oraz lizę detergentem. Świadczy to o dobrym rozumieniu trudności analizy pojedynczych EV. Jednocześnie pomiary wykonywane bezpośrednio w natywnym osoczu i płynie otrzewnowym należy opisywać konsekwentnie jako analizę cząstek dodatnich dla określonych markerów, ponieważ nie każdy rejestrowany sygnał musi odpowiadać pojedynczemu, klasycznemu EV. Doktorantka w większości zachowuje tę ostrożność terminologiczną. Dobrym kierunkiem dalszych prac byłoby przygotowanie panelu markerów celowo zbudowanego na podstawie wyników proteomicznych tej rozprawy, ponieważ wykorzystany panel IFCM był wcześniej walidowany technicznie, ale nie był projektowany specyficznie dla endometriozy.

Dyskusja jest obszerna, świadczy o bardzo dobrej orientacji Doktorantki w piśmiennictwie i pokazuje umiejętność łączenia wyników z szerszym obrazem biologii choroby. Autorka nie ogranicza się do prostego katalogu różnicujących białek, lecz grupuje je w funkcjonalne osie obejmujące odporność wrodzoną, stres oksydacyjny, metabolizm żelaza, macierz zewnątrzkomórkową, adhezję, cytoskielet, autofagię i regulację epigenetyczną. To podejście jest dojrzałe i nadaje pracy wartość poznawczą. W kilku miejscach interpretacja wykracza jednak poza to, co bezpośrednio wynika z badania. Dotyczy to zwłaszcza sformułowań sugerujących aktywną rolę EV w wywoływaniu określonych procesów, związek z transformacją nowotworową lub zdolność markerów do różnicowania stopnia zaawansowania. Ponieważ nie wykonano doświadczeń funkcjonalnych ani niezależnej

walidacji klinicznej, wyniki wspierają przede wszystkim hipotezy mechanistyczne i wskazują kandydatów do dalszych badań.

Wnioski odpowiadają przedstawionym wynikom i trafnie podkreślają różnice między lokalnym profilem EV w płynie otrzewnowym a bardziej subtelnym sygnałem systemowym w osoczu. Słusznie wskazano też komplementarność proteomiki i IFCM. Warto jednak konsekwentnie używać określenia „kandydaci na biomarkery” i unikać formułowania zbyt daleko idących wniosków o ich diagnostycznej przydatności przynajmniej przed oceną czułości, swoistości, AUC, wartości predykcyjnych oraz powtarzalności w niezależnej kohorcie.

Praca jest napisana dobrym językiem naukowym, choć wymaga końcowej korekty redakcyjnej. Występują powtórzenia numeracji rozdziałów, a także kilka różnic pomiędzy opisem tekstowym, podpisami rycin i liczbami białek. Te niedoskonałości nie wpływają na zasadniczą wartość naukową rozprawy, ale przed jej zarchiwizowaniem powinny zostać usunięte.

Podsumowując ocenę części merytorycznej, za najważniejsze osiągnięcie rozprawy uważam stworzenie wieloplatformowego obrazu EV w dwóch biologicznie odmiennych, ale powiązanych przedziałach. Doktorantka wykazała, że profil białkowy EV z płynu otrzewnowego odzwierciedla intensywne lokalne procesy zapalne, immunologiczne i przebudowę tkanek, natomiast EV z osocza zawierają słabszy, lecz potencjalnie dostępny klinicznie sygnał systemowy. Przedstawione wyniki nie kończą drogi do biomarkera, ale wyznaczają racjonalny kierunek kolejnych badań: od walidacji celowanej, przez rozwój panelu powierzchniowego EV, po ocenę kliniczną w większej i bardziej zróżnicowanej populacji. Jest to realny i wartościowy wkład w rozwój badań nad endometriozą.

Ocena końcowa

Rozprawa mgr inż. Karoliny Magdaleny Soroczyńskiej dotyczy ważnego i nadal nierozwiązanego problemu naukowego oraz klinicznego. Praca wymagała opanowania wielu zaawansowanych technik laboratoryjnych i analitycznych, umiejętnego zarządzania złożonym materiałem biologicznym oraz samodzielnej interpretacji wielowymiarowych danych proteomicznych. Doktorantka wykazała się bardzo dobrą znajomością biologii endometriozy i EV, krytycznym podejściem do ograniczeń zastosowanych metod oraz zdolnością do formułowania nowych hipotez badawczych.

Za szczególnie wartościowe uważam: bezpośrednie porównanie EV z płynu otrzewnowego i osocza pochodzących od tych samych pacjentek, wielowarstwową

charakterystykę preparatów zgodną z aktualnymi standardami dziedziny, dużą głębokość analizy proteomicznej, integrację danych funkcjonalnych oraz zastosowanie IFCM jako metody komplementarnej i potencjalnie translacyjnej. Oryginalność pracy polega nie na wskazaniu jednego gotowego biomarkera, lecz na stworzeniu spójnej mapy molekularnej łączącej lokalne środowisko otrzewnowe z sygnałem systemowym oraz na wytypowaniu konkretnych białek i fenotypów EV do dalszej walidacji.

W mojej ocenie rozprawa prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki w dyscyplinie nauki medyczne, dokumentuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej i zawiera oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Spełnia zatem wymagania określone w art. 187 ust. 1 i 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Rozprawę oceniam pozytywnie i wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr inż. Karoliny Magdaleny Soroczyńskiej do publicznej obrony rozprawy doktorskiej.

Na szczególne podkreślenie zasługuje ponadprzeciętny zakres metodologiczny rozprawy, obejmujący kompleksową i zgodną z aktualnymi standardami charakterystykę pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, proteomikę ilościową oraz cytometrię przepływową na poziomie pojedynczych pęcherzyków. Zakres wykonanych badań, jakość zastosowanego warsztatu oraz uzyskane wyniki wykraczają ponad standard typowy dla rozprawy doktorskiej i stanowią wartościowy wkład w badania nad patofizjologią endometriozy oraz biologicznym znaczeniem pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. W związku z powyższym wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr inż. Karoliny Soroczyńskiej.

Dr hab. n med. Piotr Pierzyński

