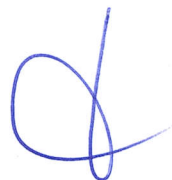


Recenzja pracy doktorskiej
lek. med. Małgorzaty Anny Nowickiej

Stężenia białek VEGF, EG-VEGF i sVEGF-R1 w płynie pęcherzykowym i surowicy oraz ekspresja mRNA dla VEGF i EG-VEGF w komórkach ziarnistych u kobiet poddanych kontrolowanej stymulacji jajników a ryzyko zespołu hiperstymulacji

We współczesnym społeczeństwie narasta problem niepłodności. Jesteśmy świadkami ogromnego zainteresowania pacjentów leczeniem niepłodności, a jednocześnie brakiem postępów w leczeniu zachowawczym niepłodności i rozwoju metod rozrodu wspomaganego medycznie. Leczenie metodami rozrodu wspomaganego wymaga stymulacji mnogiego jajczkowania. Jednym z najważniejszych i najgroźniejszych powikłań stymulacji jest zespół hiperstymulacji jajników. Wzrost wielu pęcherzyków powoduje uwolnienie mediatorów zwiększających przepuszczalność naczyń i błon jam ciała. To jatrogenne powikłanie stymulacji jajczkowania cechuje się dużym zróżnicowaniem obrazu klinicznego. Zwiększona przepuszczalność powoduje pojawienie się trzeciej przestrzeni - w układzie krążenia dochodzi do hemokoncentracji, wywołania zaburzeń elektrolitowych i szeregu kolejnych konsekwencji groźnych dla życia.

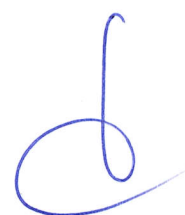
Dziś potrafimy wskazać na kliniczne czynniki predysponujące do wystąpienia zespołu, podjąć postępowanie zmniejszające ryzyko rozwoju zespołu przed stymulacją, zaproponować optymalny i bezpieczny protokół, ale nadal idea kliniki wolnej od zespołu hiperstymulacyjnego nie została do końca zrealizowana.



Przesłana mi do recenzji praca lek. med. Małgorzaty Nowickiej dotyczy niezwykle aktualnego i trudnego klinicznie problemu, dlatego temat podjęty przez doktorantkę i model badawczy wydaje mi się ze wszelkich miar słuszny.

Przedstawiona mi do recenzji praca liczy 134 strony, cytuje 380 pozycji. W bardzo obszernym wstępie doktorantka przedstawia pierwsze opisy zespołu hiperstymulacyjnego, omawia protokoły stymulacyjne, czynniki ryzyka jego wystąpienia, objawy rozwijającego się zespołu, podział kliniczny powikłania, leczenie zespołu. W dalszej części przeglądu piśmiennictwa doktorantka koncentruje się nad omówieniem dotychczasowej wiedzy o patomechanizmie uczestniczącym w rozwoju zespołu i roli, jaką w jego mechanizmie pełnią białka z rodziny czynników wzrostu śródbłónka naczyniowego oraz jego receptory. Omawia również czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego, pochodzącego z gruczołów wydzielania wewnętrznego (Endocrine gland derived vascular endothelial growth factor (EG-VEGF)) zwanego również prokinetyną 1.

Tak jak Doktorantka przedstawiła w przeglądzie piśmiennictwa, mimo postępu w poznawaniu mechanizmów dalecy jesteśmy od możliwości celowanego leczenia zespołu hiperstymulacyjnego. Warto zwrócić uwagę, że największy postęp w zapobieganiu wystąpienia zespołu wiąże się z protokołem z antagonistą GnRH, wyzwoleniem piku owulacyjnego agonistą GnRH i stosowanie polityki mrożenia wszystkich zarodków z transferem w cyklu naturalnym. W mojej ocenie przegląd piśmiennictwa dokonany przez Doktorantkę zawiera wszystkie istotne informacje o dotychczasowej wiedzy o zespole hiperstymulacyjnym i patomechanizmie prowadzącym do wystąpienia tego jatrogennego powikłania.



Podejmując badania, Doktorantka postawiła jako główne zadanie identyfikację mechanizmów powstawania zespołu hiperstymulacji u pacjentek poddawanych kontrolowanej stymulacji jajników.

Realizując założony główny cel badań Doktorantka dokonała:

1. Oceny stężeń VEGF, EG-VEGF i sVEGF-R1 w płynie pęcherzykowym i surowicy oraz ekspresji mRNA VEGF i EG-VEGF w komórkach ziarnistych z małych i dużych pęcherzyków od pacjentek, u których wystąpił zespół hiperstymulacji jajników, oraz w zależności od protokołu stymulacji i porównaniu z w/w stężeniami u pacjentek, u których OHSS nie wystąpił.

2. Oceny częstości występowania poszczególnych stopni OHSS w zależności od protokołu stymulacji w porównaniu do grupy kontrolnej.

3. Porównania stężeń VEGF, EG-VEGF i sVEGF-R1 w płynie pęcherzykowym i surowicy oraz ekspresji mRNA VEGF i EG-VEGF w komórkach ziarnistych w grupie pacjentek, które zaszły w ciążę w procedurze IVF, oraz w grupie pacjentek, u których ciąży nie uzyskano.

4. Korelacji stężeń VEGF, EG-VEGF i sVEGF-R1 w płynie pęcherzykowym i surowicy oraz ekspresji mRNA VEGF i EG-VEGF w komórkach ziarnistych u pacjentek z OHSS z poznanymi dotychczas czynnikami ryzyka zespołu hiperstymulacji jajników (młody wiek, BMI, FSH, AMH, stężenie estradiolu, przebyty wcześniej OHSS, duża liczba pobranych komórek).

Doktorantka przeprowadziła badania w grupie 148 kobiet leczonych metodą pozaustrojowego zapłodnienia, w 3 grupach wyróżnionych w zależności od zastosowanego protokołu stymulacji mnogiej owulacji.

Doktorantka założyła, że badania będą miały również aspekt aplikacyjny i być może oznaczanie stężenia białek VEGF, EG-VEGF i sVEGR-R1 w surowicy lub



płynie pęcherzykowym pozwoli precyzyjnie oszacować ryzyko wystąpienia zespołu hiperstymulacji jajników.

Grupą kontrolną było 48 pacjentek, u których pobierano komórki w cyklu naturalnym.

Grupami badanymi było: 49 pacjentek stymulowanych gonadotropinami w długim protokole z agonistą oraz 51 pacjentek stymulowanych gonadotropinami w protokołach z antagonistami.

Oznaczanie stężenia VEGF w surowicy oraz w płynie pęcherzykowym wykonano przy użyciu zestawów do testów immunoenzymatycznych ELISA (*Human VEGF ELISA Test Kit Manual*®) firmy MaxDiscovery, Bioo Scientific (USA).

Oznaczanie stężenia EG-VEGF w surowicy oraz w płynie pęcherzykowym wykonano przy użyciu zestawów do testów immunoenzymatycznych ELISA (*Human EG-VEGF ELISA Kit*®) firmy Nordic BioSite (Szwecja).

Oznaczanie stężenia sVEGF-R1 w surowicy oraz w płynie pęcherzykowym wykonano przy użyciu zestawów do testów immunoenzymatycznych ELISA (*Human sVEGF R1/Flt-1 Immunoassay*®) firmy R&D System, Minneapolis (USA).

Ekspresję mRNA oceniono metodą RT –PCR.

Analizę statystyczną lek. med. Małgorzata Nowicka przeprowadziła z zastosowaniem programu STATISTICA 13.0. W celu zbadania, czy badane cechy jakościowe różnicują cechy ilościowe istotne w analizie, Doktorantka stosowała przy cechach jakościowych binarnych test U Manna-Withneya, a przy pozostałych cechach – test Kruskala-Wallisa.

Dla porównania rozkładów wielu cech ilościowych (zależnych) korzystała z testu Friedmana, a przy cechach jakościowych – test Fishera. W badaniach wykorzystano również statystyczną metodę analizy logarytmiczno-liniowej i zbudowano modele oparte na bezwarunkowej regresji logistycznej, obrazujące



wpływ różnych cech na wybrane cechy jakościowe. Przy wyznaczaniu punktów odcięcia zastosowała analizę ROC. Dla cech binarnych obliczono również szanse *Od Ratio* (OR), z przedziałem ufności (CI – ang. *Confidence Interval*) 95%. Wyniki badań własnych Doktorantka przedstawiła na 15 rycinach i w 2 tabelach.

W badaniu Doktorantka nie wykazała różnic w częstości występowania zespołu hiperstymulacji jajników, jak i poszczególnych stopni ciężkości jego przebiegu między grupami badanymi, czyli stymulowanymi gonadotropinami w protokole długim z agonistą GnRH i z antagonistą GnRH. W opinii recenzenta, rozbieżność między literaturą a wynikami badań należy tłumaczyć małą liczebnością grup.

W grupie pacjentek, u których wystąpił wczesny OHSS, Doktorantka stwierdziła, że w dniu pobrania oocytów stężenia VEGF w płynie z dużych pęcherzyków jajnikowych były istotnie statystycznie niższe, a sVEGF-R1 – wyższe w porównaniu do kobiet, które nie rozwinęły tego zespołu. Na wystąpienie OHSS nie miały wpływu stężenia VEGF, EG-VEGF i sVEGF-R1 w surowicy, EG-VEGF w płynie pęcherzykowym, ani ekspresja mRNA VEGF i EG-VEGF w komórkach ziarnistych. Szczegółowa analiza danych wykazała, że niezależnie od protokołu stymulacyjnego obliczony stosunek stężeń VEGF/sVEGF-R1 w płynie pęcherzykowym w dniu pobrania oocytów pozwala ocenić ryzyko wystąpienia OHSS.

Według Doktorantki, wobec faktu nie stwierdzenia różnic istotnych statystycznie między wszystkimi trzema grupami w ekspresji mRNA VEGF i EG-VEGF w komórkach ziarnistych, zarówno z małych, jak i dużych pęcherzyków jajnikowych a różnicami w stężeniach w płynie pęcherzykowym i surowicy inne czynniki mogą wpływać na te cząsteczki i modyfikować ich działanie na poziomie funkcjonalnym. W opinii recenzenta na obserwowane różnice może wpływać wielkość puli pęcherzyków obecnych w jajnikach i odpowiadających



na hCG. Być może, gdyby w kolejnych dniach oznaczyć badane białka we krwi, zarysowywałyby się wyraźne różnice. Czas trwania ekspozycji na hCG odgrywa zasadniczą rolę w rozwoju zespołu.

W grupie pacjentek, które nie zaszły w ciążę, stężenia EG-VEGF w płynie pęcherzykowym z dużych pęcherzyków były istotnie wyższe w porównaniu do grupy pacjentek, u których ciążę uzyskano. Nie stwierdzono różnic w stężeniach EG-VEGF w płynie pęcherzykowym z małych pęcherzyków i w surowicy, w stężeniach VEGF i sVEGF-R1 w surowicy i w płynie pęcherzykowym z małych i dużych pęcherzyków, w ekspresji mRNA VEGF i EG-VEGF.

Z obowiązku recenzenta chciałbym zaproponować, aby nie używać określenia krótki protokół w odniesieniu do protokołu z antagonistą. W literaturze nazwę protokół krótki używa się do protokołu z agonistą podawanym od pierwszego dnia cyklu. Uważam również, że nie należy używać słowa „ilość” w połączeniu z rzeczownikami policzalnymi, a więc liczba pacjentek, komórek jajowych, ciąż i tak dalej a nie ilość. Uważam również, że zamiast pisać „*nie wykazano wpływu stężeń na uzyskanie ciąży*” należy pisać o braku zależności między stężeniami EG – VEGF a szansą na ciążę.

Lek. med. Magdalena Nowicka przedyskutowała wyniki własne z danymi z piśmiennictwa. Przeprowadzona przez Doktorantkę dyskusja świadczy, że dobrze poznała badaną tematykę. Dyskusję tę oceniam bardzo wysoko. Doktorantka potrafi krytycznie spojrzeć na dane z literatury i wyniki badań własnych. W planowaniu dalszych badań proponowałbym oznaczanie we krwi stężenia badanych substancji w kolejnych dniach fazy lutealnej i do badań kwalifikować pacjentki po wcześniejszym oznaczeniu AMH i AFC. Ciekawą grupą byłyby pacjentki stymulowane w protokole z antagonistą, u których pik owulacyjny wyzwalano by agonistą i wszystkie zarodki poddano by witrifikacji.

Praca ma nieco nietypowy układ i nie wyodrębniono wniosków, a

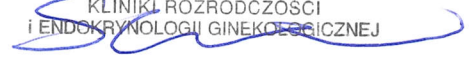


Doktorantka raczej omówiła wyniki i podsumowała w rozdziale poprzedzającym dyskusję. Osobiście skłaniałbym się do wersji tradycyjnej, w której wnioski byłyby wypunktowane. Niewątpliwie najważniejszym wnioskiem jest stwierdzenie, że stosunek stężeń VEGF/sVEGF może posłużyć do wczesnej oceny ryzyka rozwoju OHSS.

Po przeanalizowaniu całej pracy uważam, że dotyczy ona bardzo ciekawego problemu, została przeprowadzona przy zastosowaniu wielu metod, wyniki są dobrze udokumentowane i dostarczają nowych faktów, pozwalając lepiej rozumieć patogenezę zespołu OHSS.

Dokonana przeze mnie ocena pracy doktorskiej pozwala mi na stwierdzenie, że praca lek. med. Magdaleny Anny Nowickiej spełnia wszystkie warunki stawiane rozprawom doktorskim w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki i zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Matki i Dziecka w Warszawie o dopuszczenie lek. med. Magdaleny Anny Nowickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

B. → Lh 12.10.2018

KIEROWNIK
KLINIKI ROZRODCZOŚCI
i ENDOKRYNOLOGII GINEKOLOGICZNEJ

prof. dr hab. n. med. Sławomir Wolczyński