

Dr hab. n. med. Anna Ziomkiewicz-Wichary
Zakład Antropologii
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej
Polska Akademia Nauk

Zakład Antropologii
Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych
Uniwersytet Jagielloński

Recenzja rozprawy doktorskiej
przedstawionej przez Panią mgr Małgorzatę Jusiakowską-Piputę
i zatytułowanej „Zmienność stężenia hormonu anty-Müllerowskiego i hormonu
folikulotropowego u kobiet w wieku rozrodczym w zależności od prawidłowej lub zaburzonej
funkcji jajników”

Przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani mgr Małgorzaty Jusiakowskiej- Piputy została wykonana w Zakładzie Biologii Rozwoju Człowieka Instytutu Biologii i Ewolucji Człowieka Uniwersytetu im Adama Mickiewicza w Poznaniu. Badania będące przedmiotem rozprawy przeprowadzono we współpracy z Kliniką Niepłodności i Endokrynologii Rozrodu Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu oraz Kliniką Leczenia Niepłodności InviMed we Wrocławiu, pod kierownictwem doktorantki. Na wyróżnienie zasługuje ogromny wkład pracy Doktorantki polegający na koordynowaniu badania i zbierania danych pochodzących z dwóch znacząco oddalonych od siebie ośrodków klinicznych.

Przedłożona praca porusza ważne zarówno z punktu widzenia klinicznego jak i naukowego zagadnienia nieprawidłowości funkcji żeńskiego układu rozmnażania w tym syndromu policystycznych jajników (PCOS) oraz przedwczesnego wygasania czynności jajników (POF). Skupia się również na zbadaniu zmienności w stężeniach hormonów anty-Müllerowskiego oraz folikulotropowego w zależności od wachlarza czynników socjoekonomicznych, historii reprodukcyjnej, parametrów cyklu menstruacyjnego, budowy ciała oraz wybranych czynników stylu życia. Hormony te stanowią ważne markery, używane w diagnozie klinicznej wymienionych powyżej dysfunkcji układu rozmnażania u kobiet jednak zakres indywidualnej zmienności ich stężeń pozostaje niedostatecznie poznany. Zagadnienia te wydają się niezwykle istotne zwłaszcza w perspektywie raportów wskazujących na wzrastający odsetek niepłodnych par w wieku reprodukcyjnym zarówno w Polsce jak i w Europie.

Materiałem, który posłużył do przeprowadzenia analiz statystycznych w rozprawie były dane zebrane od 390 pacjentek klinik leczenia niepłodności w Poznaniu i we Wrocławiu (194 kobiety ze zdiagnozowanym PCOS lub POF oraz 196 kobiet z grupy kontrolnej). Dane zebrane zostały prospektywnie, w trakcie trwającej diagnozy, choć niektóre z pytań zawartych w ankiecie badawczej dotyczyły zdarzeń z przeszłości takich jak wystąpienie menarche, urodzenie dzieci oraz poronienia.

Na podstawie zebranych danych Doktorantka podjęła się realizacji dwóch głównych zadań badawczych: 1) wyznaczenia stężeń AMH i FSH w przedziałach wiekowych dla grup kobiet z PCOS i POF na tle grupy kontrolnej z prawidłową funkcją jajników; 2) zbadania

czynników warunkujących zmienność w stężeniach tych hormonów w postaci cech cyklu menstruacyjnego, rozrodczości, somatycznych i związanych z elementami stylu życia.

Układ przedstawionej pracy jest prawidłowy. Rozprawa doktorska składa się z rozdziałów charakterystycznych dla tego typu prac: Wstęp (7 podrozdziałów), Cel pracy, zadania i hipotezy badawcze, Materiały i metody (6 podrozdziałów), Wyniki (7 podrozdziałów), Dyskusja (4 podrozdziały), Podsumowanie wyników oraz Wnioski.

We Wstępie w sposób wyczerpujący Doktorantka przedstawiła zagadnienia związane z ontogenezą układu rozmnażania człowieka, hormonalną kontrolą cyklu menstruacyjnego kobiet oraz fizjologiczną rolę AMH i FSH w procesie rozmnażania. Dokonała również przeglądu literatury dotyczącej związku stężeń opisywanych hormonów z zaburzeniami funkcji jajnika – PCOS i POF. Omówiła wreszcie genetyczne podłoża wymienionych zaburzeń.

Nie jest do końca prawdziwe, że w literaturze naukowej brakuje informacji na temat zakresu indywidualnej zmienności stężeń AMH i FSH. Prace te istnieją, choć ich wyniki w dużym stopniu zależą od przyjętej metodologii analizy biochemicznej oraz laboratorium tą analizę przeprowadzającego. Sama Doktorantka, powołuje się na normy referencyjne stężeń AMH dla kobiet z prawidłową funkcją jajnika, PCOS i POF, choć nie podaje ich źródła.

Natomiast, w bardzo okrojonym zakresie we Wstępie przedstawiła Doktorantka stan wiedzy w zakresie czynników demograficznych, reprodukcyjnych oraz stylu życia i ich związku z występowaniem dysfunkcji i stężeniem hormonów. Mimo, że badania w tym zakresie nie są tak liczne ich wyniki powinny być we Wstępie przynajmniej podsumowane. Występująca we Wstępie pewna dysproporcja w sposobie omawiania przez Doktorantkę zagadnień związanych z tematem pracy sugeruje umiarkowaną zdolność selekcji i syntezy istniejących wyników badań. Może być jednak również spowodowana znaczną komplikacją zagadnień prezentowanych przez Doktorantkę.

Zarówno cele jak i hipotezy badania sformułowane zostały w sposób jasny i przejrzysty co umożliwia w końcowej części pracy bezpośrednie odniesienie się do nich i podsumowanie uzyskanych wyników badań. Pomimo, że jako cel pracy Doktorantka identyfikuje zbadanie związku pomiędzy czynnikami stylu życia, czynnikami budowy ciała oraz charakterystyką cyklu menstruacyjnego i okresu rozrodczego a stężeniem AMH i FSH, wśród postawionych hipotez znajduje się tylko jedna dotycząca związku pomiędzy stężeniami hormonów a cechami okresu rozrodczego.

Metody przeprowadzenia badania opisane zostały w większości w sposób prawidłowy chociaż, w niektórych przypadkach niezbyt precyzyjny. Najbardziej niepełny jest, według mnie, opis grupy kobiet o prawidłowej funkcji jajnika uczestniczących w badaniu, definiowanej przez Doktorantkę jako grupa kontrolna. Jest to kwestia o tyle istotna, że część analiz statystycznych przeprowadzonych przez Doktorantkę oparta jest na porównaniach parametrów hormonalnych pomiędzy kobietami z grupy kontrolnej oraz z grupą o nieprawidłowej funkcji jajnika. Z przedstawionego opisu wynika, że analizowane w badaniu dane kobiet pochodziły od pacjentek dwóch klinik leczenia niepłodności. O ile wyłonienie grupy pacjentek z PCOS i POF oparte zostało o diagnozę lekarską, nie jest jasne w jaki sposób wyłoniona została grupa kontrolna. Czy były to pacjentki klinik? Jeśli tak, to czy cierpiały na jakiegokolwiek schorzenia, które mogłyby wpływać na uzyskane w pracy wyniki?

W sposób skrupulatny przedstawiony został opis analizy laboratoryjnej tak, że na jego podstawie możliwe byłoby odtworzenie całego procesu analizy. Moje wątpliwości dotyczą natomiast, sposobu pobierania samego materiału biologicznego (próbek krwi). Doktorantka zaznacza, że próbki krwi do analizy stężeń FSH zostały zebrane „na czczo”, w trakcie 2-3 dnia cyklu menstruacyjnego ze względu na „sprzężenie hormonu z osią płciową” co jak rozumiem

oznacza po prostu zmienność stężenia FSH w trakcie cyklu menstruacyjnego. Pobieranie próbek do oznaczania stężenia AMH nie podlegało podobnemu reżimowi. Wydaje się to być nie do końca słuszną decyzją zwłaszcza w kontekście wyników badań ilustrujących zmienność stężenia AMH w trakcie trwania cyklu menstruacyjnego.

Opisu metod oceny cech somatycznych dokonano również drobiazgowo. Doktorantka zaznaczyła, że pomiarów masy i wysokości ciała dokonywano dwu- lub trzykrotnie (w przypadku, gdy w pierwszych dwóch pomiarach nie uzyskano zgodności). Nie jest jednak jasne, czy do ostatecznej analizy statystycznej wzięto tylko pomiary zgodne czy też użyto wartości uśrednionych (średnia ze wszystkich pomiarów antropometrycznych dla danej cechy).

Moje wątpliwości budzi metoda oceny otluszczenia (zawartość procentowa tkanki tłuszczowej w organizmie). Doktorantka wspomina, że oceny tej dokonano w oparciu o pomiar grubości fałdów tłuszczowych: naramiennego, podłopatkowego i brzuszego. Wartości tych pomiarów, miały zostać użyte następnie do obliczenia procentowej zawartości tkanki tłuszczowej w oparciu o wzór. Zamieszczony w pracy wzór zaczerpnięty z publikacji Deurenberga i wsp. (1991) nie odnosi się, jednakże do pomiarów grubości fałdów tłuszczowych a jedynie do wartości BMI. Nie jest, więc jasne w jaki sposób Doktorantka dokonała oceny zawartości tkanki tłuszczowej w organizmie.

Podobnie, nie do końca jasnym pozostaje dla mnie sposób analizy danych, a w szczególności powód, dla którego dokonano zamiany zmiennych ciągłych (pochodzących z pomiarów antropometrycznych, dotyczących długości cykli menstruacyjnych, wieku badanych, itp.) na zmienne kategoryjne (kategorie BMI, dystrybucji tkanki tłuszczowej, długości cyklu menstruacyjnego oraz wieku). W przypadku każdej z wymienionych zmiennych użycie podejścia regresyjnego ze zmiennymi ciągłymi (liniowego lub nieliniowego) spowodowałoby uzyskanie dużo precyzyjniejszych i wartościowszych wyników, niż w przypadku zmiennych kategoryjnych. Stąd moje pytanie do Doktorantki o powód kategoryzacji danych? Czy był wymuszony sposobem zbierania danych przez ośrodki kliniczne?

Użycie zmiennych kategoryjnych zaowocowało także koniecznością zastosowania mniej precyzyjnych metod statystycznych. I tak na przykład zastosowanie testów χ^2 pozwoliło jedynie na stwierdzenie, że istnieją zależności pomiędzy występowaniem dysfunkcji jajnika a wiekiem badanych. Nie wiadomo jednak, w której z grup i pomiędzy którymi z kategorii wiekowych zależności te są istotne statystycznie. Podobna nieprecyzyjność występuje w przypadku niemal wszystkich zmiennych niezależnych analizowanych w kontekście występowania dysfunkcji jajnika.

Dokonując analizy czynników związanych ze stężeniem AMH i FSH Doktorantka zastosowała metody analizy wariancji i regresji liniowej i logistycznej. W przypadku ANOVA wspomniano o zastosowaniu testu Levene'a celem zbadania jednorodności wariancji w poszczególnych grupach, nie jest jednak powiedziane czy założenia jednorodności wariancji zostały spełnione. Wydaje się to wątpliwe, ze względu na znaczące różnice w liczebności badanych prób: 196 kobiet z prawidłową funkcją jajnika vs 40 z POF vs 154 z PCOS. W przypadku włączenia do analizy czynników takich jak skategoryzowany wiek badanych dysproporcje liczebności pomiędzy grupami zaznaczają się jeszcze bardziej, np. dla grupy kobiet w wieku 31-35 lat analizowano różnice w grupach 79 kobiet z normalną funkcją jajnika vs 10 kobiet z POF vs 69 kobiet z PCOS. Z tego samego powodu nieodpowiednie wydaje się zastosowanie testu post-hoc NIR, który zakłada równoliczność grup oraz równość wariancji w zakresie analizowanej zmiennej zależnej. Należy również podkreślić, że

zaproponowane przez Doktorantkę modele analizy wariancji i regresji są raczej proste. W przeważającej części jednoczynnikowe. Brakuje więc uwzględnienia w analizowanych zależnościach czynników zakłócających takich jak chociażby palenie papierosów.

Rozdział Wyniki, w sposób dokładny przedstawia rezultaty analizy statystycznej. Mimo, że na ogół wyniki analiz przedstawione są w sposób prawidłowy, niektóre sformułowania użyte przez Doktorantkę budzą pewne zastrzeżenia. Na przykład, na stronie 56 opisano wyniki analizy związku pomiędzy przynależnością do grupy wiekowej a występowaniem prawidłowej lub nieprawidłowej funkcji jajnika (PCOS, POF). Doktorantka raportuje, że „W najmłodszej grupie, kobiety z PCOS stanowiły 28% podczas gdy z POF tylko 15%.” Ten opis pozostaje w sprzeczności z wynikami przedstawionymi w Tabeli 1, z której wynika, że spośród kobiet z PCOS 28% było w najmłodszej grupie wiekowej a wśród kobiet z POF 15% było w tej samej grupie wiekowej. Te dwa opisy nie są sobie równoważne.

Na stronie 60 przedstawiono wyniki analizy dotyczącej odsetka palenia w grupach kobiet z normalnym i dysfunkcyjnym jajnikiem. Odsetek kobiet palących w każdej z grup funkcji jajnika wynosił lub był niższy niż 10%. W związku z doniesieniami z literatury dotyczącymi wpływu palenia na stężenie hormonów reprodukcyjnych i AMH, wydaje się być zasadnym wyłączenie z analizy danych kobiet palących lub przynajmniej kontrolowanie faktu palenia papierosów w kolejnych analizach statystycznych. Nie jest jasne jednak, czy wpływ palenia został w dalszych analizach w jakikolwiek sposób uwzględniony.

Na stronie 62 opisano wyniki analizy dotyczącej występowania objawów około menstruacyjnych u kobiet w zależności od funkcji jajnika. Opis ten choć niezwykle ciekawy jest nieco zaskakujący, ponieważ w opisie metod badania nie zasygnalizowano choćby, że takie dane w ogóle były zbierane. Nie zaznaczono również jakiego narzędzia użyto by zebrać te dane. Ryciny 13 i 14 przedstawiają graficzną ilustrację tych wyników. Niestety, niejasnym jest co oznaczają słupki przedstawione na tych wykresach.

Na stronie 63, przedstawiając wyniki analizy regresji dotyczącej zależności pomiędzy wiekiem a stężeniem AMH Doktorantka stwierdza, że wyniki te potwierdzają występujące różnice w poziomie hormonów u badanych z dysfunkcją jajników w porównaniu do grupy z prawidłową funkcją jajników. Według mojej najlepszej wiedzy analiza regresji nie może potwierdzać występowania różnic w stężeniach. Może natomiast obrazować różnice w kierunku zależności pomiędzy stężeniem hormonów a wiekiem w poszczególnych grupach. Wskazaniem byłoby umieszczenie dokładnych wyników analizy regresji w oddzielnej tabeli ze względu na mało precyzyjny opis.

Kolejne części opisu stanowią rezultaty analizy wariancji. Tak jak zaznaczono wcześniej zastosowanie testu post-hoc NIR do analizy różnic między poszczególnymi grupami wydaje się błędne ze względu na prawdopodobnie nierówne wariancje oraz nierównoliczne grupy. Na stronie 74 Doktorantka opisuje zależność pomiędzy stężeniem AMH i FSH oraz liczbą poronień. Dokonując opisu wspomina o braku istotnej interakcji pomiędzy stężeniem AMH, FSH i liczbą poronień. O ile w języku potocznym takie stwierdzenie może nie budzić zastrzeżeń o tyle w statystycznej analizie wariancji słowo „interakcja” dotyczy wspólnego efektu dwóch zmiennych niezależnych na zmienną zależną. Jeśli dobrze rozumiem sposób raportowania wyników w tabeli 9 AMH i FSH były zmiennymi zależnymi w analizie, nie można więc mówić o efekcie interakcji.

Błędnym również wydaje się przedstawianie i porównywanie współczynników cząstkowych eta-kwadrat w przypadku nieistotnych wyników analizy wariancji. Nie można mówić o tym w jaki sposób poszczególne składniki modelu wyjaśniają zmienność w stężeniach hormonów, skoro cały model, z punktu widzenia statystycznego niczego nie

wyjaśnia. Błąd ten powtarza się w opisie kolejnych analiz wariancji. Tym bardziej nieuprawnione jest także, w takim przypadku wyliczanie stosunków pomiędzy wartościami eta i mówienie np. o tym, że WHR w stosunku do BF% wyjaśnia zmienność AMH na poziomie wartości 0.23.

W Dyskusji obszernie omówiono otrzymane wyniki badań. Stosunkowo starannie Doktorantka odnosi się do wyników poprzednich opublikowanych badań. Jasno wynika z tej części pracy, że posiada ona szeroką wiedzę i znajomość literatury w analizowanym zakresie. Jednak podobnie jak w przypadku poprzednich części rozprawy w Dyskusji sporo jest nieprecyzyjnych interpretacji otrzymanych wyników. Na przykład wielokrotnie Doktorantka mówi o najwyższych i najniższych średnich wartościach stężeń hormonów lub o kilkukrotnie wyższych/niższych stężeniach w grupach pomimo, iż wyniki analiz oraz przedstawione wykresy średnich wskazują na ewidentny brak istotnych różnic ze względu na znaczącą wariancję wyników w grupach. Tak dzieje się na przykład w przypadku niektórych wyników analizy wariancji różnic w stężeniach FSH i AMH w grupach wieku i czynności jajników, w grupach wieku menarche oraz otłuszczenia i dystrybucji tkanki tłuszczowej.

Ponadto, Doktorantka podkreśla wielokrotnie, że dokonała oceny wpływu czynników socjoekonomicznych na zmienność stężenia AMH i FSH oraz funkcję jajników. Podczas gdy w rzeczywistości, dokonała ona głównie oceny częstości występowania poszczególnych kategorii czynników jak wykształcenie czy miejsce zamieszkania w grupach kobiet z prawidłowym lub dysfunkcyjnym jajnikiem. Zaobserwowane różnice mogą być związane chociażby z dostępnością do usług medycznych i diagnozy lekarskiej w kontrastujących pod tymi względami kategoriach kobiet. Wytłumaczenie to może być adekwatne zwłaszcza w przypadku pacjentek kliniki Invimed z Wrocławia, która jest prywatną placówką opieki zdrowotnej.

Wreszcie, w części poświęconej dyskusji wyników dotyczących depresji Doktorantka niemal w sposób zamienny stosuje pojęcia depresji i stresu. Sam tytuł podrozdziału sugeruje, że omawiane będą wyniki dotyczące nasilenia stresu, którego nie oceniała ona w swojej pracy w żaden sposób. Porównując własne wyniki w zakresie depresji, Doktorantka powołuje się na prace z literatury dotyczące poziomu stresu u kobiet z niepłodnością i zaburzoną pracą jajników. Należy z całą mocą podkreślić, że o ile stres psychospołeczny jest normalną, fizjologiczną odpowiedzią na pojawiające się w środowisku bodźce natury społecznej, o tyle depresja jest stanem chorobowym, który niekoniecznie musi być związany z takimi bodźcami środowiskowymi.

Pracę zamykają Podsumowanie wyników oraz Wnioski. W Podsumowaniu Doktorantka w sposób jednoznaczny wymienia czynniki, w zakresie których uzyskała statystycznie istotne efekty. Do czynników tych należą wiek badanych, długość cyklu menstruacyjnego, fakt wystąpienia jednego poronienia a także wskaźnik WHR w przypadku kobiet z prawidłową funkcją jajników oraz zawartość tkanki tłuszczowej w organizmie w przypadku kobiet z dysfunkcją jajników. Na podstawie tak przeprowadzonego podsumowania wyników można stwierdzić, że pomimo wymienionych uchybień Doktorantka osiągnęła cel pracy i w sposób prawidłowy zweryfikowała postawione hipotezy. Wnioski, które autorka zawiera w końcowej części pracy oparte są nie tylko na własnych wynikach, ale również na podstawie dokonanego w toku pisania rozprawy przeglądu literatury. Zawierają, ważne z punktu widzenia praktycznego wskazówki dla kobiet cierpiących na zaburzenia płodności oraz leczących ich klinicystów.

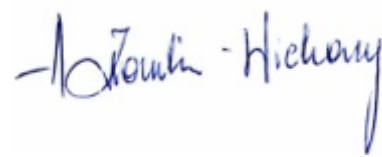
Przeprowadzone przez Doktorantkę badanie wymagało dużego nakładu pracy. Autorce udało się zgromadzić liczną, w porównaniu z innymi opublikowanymi pracami grupę

badawczą. Przeanalizowała również szeroki wachlarz czynników, które starała się powiązać ze zmiennością w stężeniach hormonów AMH oraz FSH a także z występowaniem dysfunkcji jajnika. Pomimo tego, w toku analizy statystycznej udało się zidentyfikować stosunkowo niewiele czynników, które w sposób istotny wpływać mogą na zmienność w stężeniach AMH i FSH zarówno w przypadku kobiet z prawidłową czynnością jajnika jak i jego dysfunkcją. Przyczyn takiego stanu rzeczy dopatruję się w stosunkowo prosto przeprowadzonej analizie statystycznej. W związku z tym, prosiłabym Doktorantkę o wyjaśnienie w jaki sposób wyniki przeprowadzonego przez nią badania można odnieść do populacji generalnej kobiet z prawidłową funkcją jajnika, PCOS i POF.

Analiza związku pomiędzy występowaniem objawów około menstruacyjnych a stężeniem hormonów AMH i FSH oraz dysfunkcją jajnika jest stosunkowo świeżym zagadnieniem. Przegląd literatury w tym zakresie nie dostarcza wielu opublikowanych prac. Prosiłabym Doktorantkę o przedstawienie przesłanek, dla których zdecydowała się na analizę tej zależności.

Podsumowując, ze względu na aktualną tematykę badania, wartościowy materiał zebrany w jego trakcie oraz biorąc pod uwagę duży nakład pracy włożony w przeprowadzenie badania, przedstawioną do recenzji rozprawę oceniam pozytywnie. Ostateczna jej ocena będzie jednak w dużej mierze zależała od tego w jaki sposób Doktorantka ustosunkuje się do przedstawionych w recenzji zastrzeżeń.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska pt: „Zmienność stężenia hormonu anty-Müllerowskiego i hormonu folikulotropowego u kobiet w wieku rozrodczym w zależności od prawidłowej lub zaburzonej funkcji jajników” autorstwa Pani mgr Małgorzaty Jusiakowskiej-Piputy spełnia wszystkie wymagania określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65, poz.595 ze zm.) stawiane pracom doktorskim. W związku z tym zwracam się z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr Małgorzaty Jusiakowskiej-Piputy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



dr hab. Anna Ziomkiewicz-Wichary

Kraków, dnia 25 czerwca 2020 r.