

Katedra i Klinika Endokrynologii Ginekologicznej
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu

Department of Gynaecological Endocrinology
Karol Marcinkowski University of Medical Sciences
in Poznań

tel.(061) 8419366

fax.(061) 8419454

60-535 Poznań, ul. Polna 33

Prof. dr hab.n.med Błażej Męczekalski
Kierownik Katedry i Kliniki Endokrynologii
Ginekologicznej UM w Poznaniu

Poznań, 21.11.2018

**Ocena rozprawy na stopień doktora nauk medycznych mgr Ewy Pastuszek
„Ocena wpływu stopnia fragmentacji DNA plemników na płodność
mężczyzn. Porównanie dwóch metod badawczych : TUNEL i Comet assay”.**

Przedstawiona do recenzji praca została wykonana w Klinice Leczenia Niepłodności Invicta w Gdańsku oraz w Zakładzie Pielęgniarstwa Położniczo-Ginekologicznego, Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem Prof. dr hab. med. Krzysztofa Łukaszuka. Promotorem pomocniczym jest dr Jolanta Kiewisz.

Niepłodność męska jest obecnie istotnym problemem klinicznym. Według danych Światowej Organizacji Zdrowia (World Health Organization; WHO) podobnie jak niepłodność żeńska odpowiada za około 20-30 % ograniczenia sprawności rozrodczej. Natomiast 25-40% niepłodności wynika z ograniczenia funkcji rozrodczych jednocześnie u obu partnerów. Niepłodność idiopatyczna stanowi około 10-20 % przyczyn całej puli niepłodności.

Klinicznie niepłodność męska z jednej strony odnosi się do zaburzeń współżycia płciowego u mężczyzny a z drugiej strony do upośledzenia jakości nasienia (objętość ejakulatu, koncentracja plemników, ich ruchliwość oraz budowa).

Pomimo, że plemniki zostały po raz pierwszy zidentyfikowane w roku 1677 przez wynalazcę mikroskopu Antoniego van Leeuwenhoek'a minąć musiało jednak około 300 lat, żeby badania jakości nasienia zostały wprowadzone do praktyki klinicznej. Pierwsze normy

jakości nasienia opublikowano dopiero w roku 1980. Wiązało się to z faktem, że przez długi czas uważano, że za niepłodność małżeńską odpowiada wyłącznie czynnik żeński.

Współcześnie należy zauważyć, że klasyczne badanie nasienia nie wyjaśnia wszystkich przyczyn niepłodności męskiej. Co więcej prawidłowy wynik klasycznego badania nasienia nie wyklucza udziału czynnika męskiego w niepłodności.

Według danych naukowych podwyższony poziom fragmentacji DNA plemnikowego może być przyczyną niepłodności idiopatycznej w 15-20%. To właśnie badanie fragmentacji DNA plemnikowego stanowi nowe narzędzie w nowoczesnej andrologii. Podstawowe znaczenie ma wykrywanie pęknięć DNA stosowanymi w tym zakresie dwoma wiodącymi metodami : metoda TUNEL (ang. Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick and labeling) oraz metoda kometowa w pH obojętnym (ang. Neutral Comet assay).

Celem pracy doktorskiej było dokonanie analizy parametrów nasienia pacjentów, u których zastosowano procedurę ICSI i porównanie dwóch metod badawczych (TUNEL i Comet Assay) służących do oceny stopnia fragmentacji DNA plemników pod kątem ich czułości i swoistości oraz wartości progowych. Cel został sformułowany trafnie i precyzyjnie.

Recenzowana praca doktorska powstała w oparciu o 3 prace opublikowane w czasopiśmie o wysokim impact factor (IF). Doktorantka w 2 pracach oryginalnych i jednym liście do redakcji w sposób syntetyczny a jednocześnie wyczerpujący przedstawiła problem oceny wpływu stopnia fragmentacji DNA plemników na płodność mężczyzn.

Mgr Ewa Pastuszek w 2 pracach jest pierwszą autorką, natomiast w jednej pracy drugą autorką.

Łączny impact factor (IF) przedstawianego cyklu prac wynosi 5.957 (punkty MNiSW w liczbie 70)

1. E. Pastuszek, J. Kiewisz, P.M. Kulwikowska, M. Lukaszuk, K. Lukaszuk; Sperm parameters and DNA fragmentation of balanced chromosomal rearrangements carriers; *Folia Histochemica et Cytobiologica*. 2015;53(4):314-321. doi:10.5603/fhc.a2015.0032 (praca oryginalna)

(IF: 1.060; MNiSW: 15)

2. K. Lukaszuk, E. Pastuszek, A. Samojedny; Comment on: "Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI) does not improve outcome in patients with two successive IVF-ICSI failures" by Gatimel et al., *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2016;33(9):1253-12534. doi: 10.1007/s10815-016-0746-9 (list do redakcji)

(IF: 2.163; MNiSW: 20)

3. E. Pastuszek, J. Kiewisz, P. Skowronska, J. Liss, M. Lukaszuk, A. Bruszczyńska, G. Jakiel, K. Lukaszuk; An investigation of the potential effect of sperm nuclear vacuoles in human sperm on DNA fragmentation using a neutral and alkaline Comet assay; *Andrology*. 2017;5(2):392-398. doi: 10.1111/andr.12324 (praca oryginalna)

(IF: 2.734; MNiSW: 35)

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska obejmuje : wykaz prac będących przedmiotem rozprawy, wstęp (w którym doktorantka opisuje niepłodność męską, metody oceny niepłodności męskiej, wpływ uszkodzeń DNA plemników na płodność , metody badania fragmentacji plemników, metody wspomaganego rozrodu), cel pracy, materiał i metody, badania wstępne, omówienie prac będących przedmiotem rozprawy, wnioski, streszczenie w języku polskim o angielskim, bibliografię (w liczbie 95 pozycji) oraz oświadczenie współautorów.

Pragnę zwrócić uwagę na nieścisłość podaną przez autorkę na stronie 4 rozprawy doktorskiej. Przedstawiając kryteria prawidłowych wartości nasienia w oparciu o podręcznik WHO dotyczący oceny nasienia (z 2010 roku) autorka podaje, że według tego podręcznika prawidłowa koncentracja plemników wynosi równo lub powyżej 39 milionów plemników w ejakulacie. Faktyczna prawidłowa koncentracja plemników wynosi równo lub powyżej 15 milionów w 1 mililitrze ejakulatu.

Wnioski w liczbie 4 zostały bardzo dobrze sformułowane. Uważam, że wniosek numer 2 powinien być doprecyzowany. Wniosek ten brzmi : „Pod względem koncentracji, ruchliwości i żywotności plemników grupa nosicieli translokacji wzajemnych nie różniła się istotnie statystycznie od grupy kontrolnej. Natomiast nosiciele translokacji Robertsonowskich, mieli najniższe parametry. W badanych grupach nie wykazano jednak statystycznie istotnych różnic w poziomie fragmentacji DNA plemników”. Zdanie „Natomiast nosiciele translokacji Robertsonowskich mieli najniższe parametry” powinno być doprecyzowane w zakresie parametry czego i które parametry.

Przygotowana w ten sposób praca doktorska jest zgodna z ustawą o stopniach naukowych oraz tytule naukowym. Stanowi bardzo interesujące, dobrze przemyślane oraz opracowane studium naukowe na temat oceny wpływu stopnia fragmentacji DNA plemników na płodność mężczyzn.



Odnosząc się do oceny merytorycznej 3 prac warto podkreślić, że autorka w 2 oryginalnych pracach wykorzystwała bardzo nowoczesne techniki z zakresu biologii molekularnej stosowane w andrologii klinicznej.

W pierwszej pracy doktorantka postawiła sobie za cel ocenę parametrów nasienia w grupie 84 pacjentów, którzy byli nosicielami translokacji zrównoważonych (49 translokacji wzajemnych [reciprocal translocation; RCT] i 35 translokacji Robertsonowskich [Robertsonian translocation, RT]). Grupę kontrolną stanowiło 57 losowo wybranych mężczyzn z prawidłowym kariotypem. Autorka wykazała, że nosiciele RT prezentują znacząco niższe parametry nasienia nie tylko w stosunku do pacjentów z prawidłowym kariotypem ale również w stosunku do nosicieli RCT. Nie wykazano natomiast różnic w zakresie fragmentacji DNA u nosicieli obu translokacji w porównaniu do mężczyzn z prawidłowym kariotypem.

Przedstawiona publikacja dowodzi dużej dojrzałości naukowej doktorantki nie tylko przez pryzmat wyboru tematu ale przede wszystkim doboru technik badawczych dobrze opisanych i zilustrowanych (ryciny i tabele) wyników ale też profesjonalnie opracowanej dyskusji.

Druga praca doktorantki ma formę listu do redakcji czasopisma naukowego J. Assist. Reprod. Genet. Praca ta dotyczy ważnej klinicznie kwestii oceny morfologicznej plemników za pomocą mikroskopu, które mają być wybrane do docytoplazmatyczne wstrzykiwanie plemników (intracytoplasmic sperm injection; ICSI). Autorka w oparciu o odniesienie się do podstawowych zasad optyki zwraca uwagę na nieprawidłowe informacje dotyczące opisu powiększenia uzyskiwanego za pomocą mikroskopu.

Przez pryzmat publikowanej pracy należy w sposób szczególny docenić dociekliwość i krytycyzm naukowy doktorantki, która potrafi w innej pracy naukowej znaleźć niedociągnięcia metodologiczne i odnieść się do nich merytorycznie.

Trzecia praca mgr Pastuszek dotyczy ewaluacji potencjalnego wpływu wakuoli jądrowych w plemnikach na fragmentację DNA przy użyciu analizy kometowej. Opisane badanie wykonano u 10 pacjentów oceniając 3920 ruchomych plemników. Rezultaty badania wskazały, że niższy stopień w skali MSOME (motile sperm organelle morphology examination) koreluje z obniżoną fragmentacją DNA. Konkluzja badania opiera się na stwierdzeniu, że obserwacja wakuoli jądrowych przy użyciu real time mikroskopu optycznego

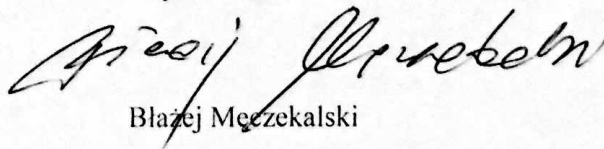
bez precyzyjnego badania fragmentacji DNA nie jest wystarczająca do optymalnej selekcji do ICSI.

Autorka pracy doktorskiej sformułowała 4 zasadne wnioski. Sformułowane wnioski w sposób optymalny realizują postawione wcześniej cele naukowe. Uwagi do wniosku numer 2 zostały przedstawione powyżej. Zastosowane metody badawcze wykorzystywane w ocenie fragmentacji DNA plemników są bardzo nowoczesne a ich porównanie jeszcze bardziej podnosi wartość pracy. Prezentacja wyników badania świadczy o dobrym przygotowaniu merytorycznym doktorantki. Natomiast sposób prowadzenia dyskusji w załączonych pracach dowodzi dojrzałości naukowej autorki.

Podsumowując stwierdzam, iż praca będąca przedmiotem niniejszej recenzji jest badaniem bardzo celowym, nowoczesnym, przynoszącym istotne wnioski z punktu widzenia naukowca badającego wpływ stopnia fragmentacji DNA plemników na płodność męską. Rozprawa ta oparta na cyklu publikacji została wykonana z dużym nakładem pracy oraz napisana bardzo starannie i przejrzysto. Dowodzi ona, że mgr Ewa Pastuszek potrafi samodzielnie rozwiązać obrany przez siebie problem naukowy realizując założone cele. Wnikliwa analiza wyników świadczy również o umiejętności krytycznego spojrzenia naukowego w pracy badawczej.

Przedstawiony mi do oceny cykl prac zatytułowany „Ocena wpływu stopnia fragmentacji DNA plemników na płodność mężczyzn. Porównanie dwóch metod badawczych : TUNEL i Comet assay” spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym w zakresie sztuki dla rozprawy na stopień doktorskiej. Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Wydziału Nauk o Zdrowiu z OP i IMMiT o dopuszczenie mgr Ewy Pastuszek do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto podkreślając bardzo wysoki poziom naukowy recenzowanej pracy doktorskiej, jej innowacyjność oraz wszystkie walory wymienione w recenzji wnioskuję o wyróżnienie pracy doktorskiej w stosownym trybie.

z wyrazami szacunku



Błażej Męczekalski