



PRACOWNIA TECHNIK DIAGNOSTYCZNYCH
WYDZIAŁ NAUK O ZDROWIU
UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE
Collegium Maximum
Ul. Staszica 4-6, Lublin
Tel. 81 448 68 92, fax. 81 448 68 21

dr hab. n. med. Artur Wdowiak

Lublin, 18 listopada 2018

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Ewy Pastuszek

pt. „Ocena wpływu stopnia fragmentacji DNA plemników na płodność mężczyzn.

Porównanie dwóch metod badawczych: TUNEL i Comet assay”

Promotor: prof. dr hab. Krzysztof Łukaszuk

Promotor pomocniczy: dr n. med. Jolanta Kiewisz

Posiadanie potomstwa jest najważniejszym celem biologicznym człowieka, warunkującym przetrwanie ludzkiego gatunku. Problemy prokreacyjne utrudniają uzyskanie ciąży prawie co piątej parze w Polsce, a podobne zjawisko obserwuje się niemal na całym świecie. W związku z tym faktem Światowa Organizacja Zdrowia uznała niepłodność za chorobę cywilizacyjną. Przyczyny tak częstego występowania problemów prokreacyjnych nie są w pełni poznane. Niewątpliwie za znaczną część niepowodzeń rozrodu odpowiada czynnik męski. Odzwierciedleniem zdolności rozrodczych mężczyzny jest wynik badania nasienia wg kryteriów WHO 2010. Należy podkreślić jednak, że sam spermogram jest niedoskonałym narzędziem do oceny męskiej płodności. Doniesienia naukowe ostatnich lat zwracają uwagę na znaczenie integralności materiału genetycznego plemnika jako czynnika wpływającego na uzyskanie ciąży, a także warunkującego zdrowie dziecka w przyszłości.

Zatem należy stwierdzić, że Autorka podjęła się ważnego dla medycyny rozrodu opracowania naukowego dotyczącego oceny wpływu stopnia fragmentacji DNA plemników na płodność mężczyzn oraz porównania dwóch metod badawczych: TUNEL i Comet assay, które jest uzasadnione zarówno z poznawczego, jak i praktycznego punktu widzenia.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska liczy 68 stron maszynopisu, a jej bibliografia zawiera 95 pozycji dobranych poprawnie, głównie najnowszych publikacji dotyczących omawianego zagadnienia. W pracy zamieszczono 1 tabelę i 5 rycin. Dodatkowo dołączono do

niej trzy artykuły naukowe z wysoko cenionych czasopism z IF: 1,060; 2,163 oraz 2,734. Należy podkreślić, że zwłaszcza czasopismo *Andrology* jest wiodącym wydawnictwem na świecie w dziedzinie męskiej płodności.

Układ pracy można nazwać konwencjonalnym, powszechnie przyjętym w dysertacjach doktorskich opartych na artykułach naukowych z dziedziny medycyny i nauk o zdrowiu. Zawiera bowiem, za spisem treści: wstęp, który jest niezbędny do uzyskania właściwych informacji wprowadzających czytelnika w problematykę podjętych badań, dobrze przedstawione cele i założenia pracy, materiał, metody, organizację i przebieg badań, wyniki przeprowadzonych badań, omówienie wyników, omówienie prac będących przedmiotem rozprawy oraz wnioski. Na końcu znajdują się oświadczenia współautorów o ich udziale w załączonych artykułach. Świadczą one o bardzo istotnym wkładzie Autorki w przeprowadzenie badań. Przywołane części stanowią logicznie powiązaną całość.

Założenia i cele pracy są ciekawe, zrozumiałe i prawidłowo sformułowane. Za cel główny Autorka przyjęła dokonanie analizy parametrów nasienia pacjentów, u których zastosowano procedurę ICSI i porównanie dwóch metod badawczych służących do oceny stopnia fragmentacji DNA plemników pod kątem ich czułości i swoistości oraz wartości progowych. Oprócz celu głównego Doktorantka spróbowała odpowiedzieć na pytanie, która z metod oceny fragmentacji DNA posiada większy potencjał w kontekście ewaluacji męskiej płodności oraz oszacowania szansy na uzyskanie ciąży oraz żywego urodzenia podczas zastosowania zapłodnienia pozaustrojowego.

Cykl prac (w tym jeden list do redakcji) poświęcony został wpływowi różnych czynników takich jak np.: nosicielstwo translokacji czy morfologia plemników na wyniki badania nasienia ze szczególnym uwzględnieniem stopnia fragmentacji DNA. Autorka skupiła się także na przyczynach trudności w interpretacji wyników badań dotyczących metod rozrodu wspomaganego. Zwiększone prawdopodobieństwo wykrycia aberracji u pacjenta z obniżoną liczbą plemników w nasieniu było opisywane przez wielu autorów. Jednak z reguły badania nie skupiały się na porównaniu innych parametrów, a jeśli już to porównywane były z parametrami dawców. W swoim badaniu Autorka porównała ejakulatory nosicieli translokacji do losowo wybranych mężczyzn z prawidłowym kariotypem. 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 wykazała jednak istotnych różnic w poziomie fragmentacji DNA plemników.

W przypadku znaczenia MSOME zarówno przegląd piśmiennictwa dotyczącego metod wspomaganego rozrodu, jak również badania Autorki, nie pozwoliły na wysnucie jednoznacznych wniosków o wpływie oglądania plemników na dużych powiększeniach na efekt w postaci ciąży. Część z wątpliwości związanych z rozbieżnością w wynikach badań wynika według Autorki z nieznamomości badaczy podstawowych zasad optyki. Autorka przedstawia pogląd,

że badacze w publikacjach naukowych powinni być zobligowani do podawania parametrów, niezbędnych do obliczenia realnego powiększenia mikroskopu i uzyskanej rozdzielczości stosowanej podczas procedury wyboru plemnika przed procedurą zapłodnienia. Pozwoliłoby to wyeliminować przynajmniej część wątpliwości związanych z rozbieżnością w wynikach badań. Niewątpliwie to istotne spostrzeżenie autorki powinno być poruszone w dyskusjach i uwzględnione w rekomendacjach towarzystw naukowych związanych z technikami rozrodu wspomaganego.

Celem kolejnego badania było określenie związku między uszkodzeniami DNA a obecnością w plemnikach wakuoli. Prawidłowa morfologia i mniej wakuoli w główce plemnika korelowało z niższym stopniem fragmentacji jego DNA. Jednak, nawet plemniki zaklasyfikowane jako klasa I MSOME nie były wolne od uszkodzeń DNA. Techniki oceny morfologii organelli ruchliwych plemników w czasie rzeczywistym nie są wystarczające do dokonania wyboru optymalnego plemnika, jednak mogą znacząco zredukować ryzyko wyboru plemnika uszkodzonego.

Spostrzeżenia Autorki są zgodne, a być może tłumaczą wyniki analizy przeprowadzonej przez Sakkas D. i wsp w Hum. Reprod. dotyczącej między innymi przydatności hyaluronic acid (HA)binding capacity oraz technologii MSOME w doborze plemnika do ICSI, która nie rozsądza jednoznacznie o przydatności tych metod w praktyce klinicznej, ani nie wykazuje wyższości jednej metody na drugą. Wg analizy Cochrane na którą powołuje się Sakkas D. i wsp. nie ma jednoznacznych dowodów, na to, że IMSI zwiększa szansę na uzyskanie ciąży, ani że obniża ryzyko wystąpienia poronienia. Spostrzeżenie autorki co do braku ujednoczenia parametrów niezbędnych do obliczenia realnego powiększenia mikroskopu i uzyskanej rozdzielczości stosowanej podczas wyboru plemnika przed procedurą zapłodnienia mogą być odpowiedzialne za wyniki Sakkas D. i wsp. [*Sperm selection in natural conception: what can we learn from Mother Nature to improve assisted reproduction outcomes? Sakkas D, Ramalingam M, Garrido N, Barratt CL. Hum Reprod Update. 2015 Nov-Dec;21(6):711-26*].

Metody badawcze zastosowane w artykułach uważam za właściwie dobrane. Dla dobrego zrozumienia zostały one opisane w pracy. Pozytywne wrażenie sprawia metodologia badań

zilustrowana prawidłowo w artykułach. Wiarygodność uzyskanych wyników potwierdza starannie przeprowadzona analiza statystyczna.

Wyniki badań przedstawione są w sposób przejrzysty, do czego przyczyniło się też prawidłowe określenie teoretycznego obszaru, w jakim poruszała się Autorka.

Przeprowadzona przez Doktorantkę dyskusja jest napisana prawidłowo i świadczy o dojrzałości naukowej Autorki. Na podstawie poprawnie przeprowadzonych analiz Doktorantka wyciągnęła cztery wnioski odpowiadające postawionym celom badawczym.

Autorka wykazała, że metoda kometowa wykazuje większy potencjał w szacowaniu szansy na uzyskanie ciąży oraz żywego urodzenia podczas zastosowania techniki ICSI. Co więcej wieloczynnikowy model regresji logistycznej, uwzględniający wyniki badania wszystkimi wariantami metody kometowej jednocześnie, pozwala na jeszcze lepsze prognozowanie wyniku.

W przypadku badania nosicieli translokacji 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.

Autorka wykazała, że autorzy publikacji naukowych powinni być zobligowani do podawania parametrów, niezbędnych do obliczenia realnego powiększenia mikroskopu i uzyskanej rozdzielczości stosowanej podczas procedury wyboru plemnika do sztucznego zapłodnienia komórki jajowej. Pozwoli to wyeliminować przynajmniej część wątpliwości związanych z rozbieżnością w wynikach badań nad MSOME.

Ostatnim sformułowanym wnioskiem jest fakt, że prawidłowa morfologia i mniej wakuoli w główce plemnika koreluje z niższym stopniem fragmentacji jego DNA. Jednak, nawet plemniki zaklasyfikowane jako klasa I MSOME nie są wolne od uszkodzeń DNA. Techniki oceny morfologii organelli ruchliwych plemników w czasie rzeczywistym nie są wystarczające do optymalnego wyboru plemników (pozbawionych uszkodzeń DNA), jednak mogą znacząco zredukować ryzyko wyboru uszkodzonego plemnika.

Wnioski wysunięte przez Doktorantkę wnoszą wybitny wkład do dziedzin nauki związanych ze zdrowiem reprodukcyjnym. Takie obserwacje są ważne z punktu widzenia możliwości ulepszenia technik rozrodu wspomaganego i zwiększenia ich skuteczności. W rozprawie doktorskiej mogła by się znaleźć informacja, czy Autorka otrzymała odpowiedź od redakcji Journal of Assisted Reproduction and Genetics w sprawie swojego komentarza. Znalazłem w rozprawie błąd literowy w pierwszym zdaniu na stronie 25 oraz brak kropki w ostatnim zdaniu na stronie 23.

Reasumując merytoryczna strona pracy zasługuje na uznanie i nie budzi zastrzeżeń. Praca akcentuje istotne aspekty związane z męskim czynnikiem niepłodności.

Doktorantka dowiodła tym samym swoją dojrzałość naukową i badawczą.

Praca od strony redakcyjnej przygotowana została poprawnie, układ jest czytelny i nie zaburza logiki rozumowania.

Przedstawiona mi do recenzji dysertacja spełnia warunki określone w art. 13 ustawy z dn. 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595; z późn. zm.) w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 30 sierpnia 2018 r. poz. 1669) określonej dalej Ustawą, zatem wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Nauk o Zdrowiu z Oddziałem Pielęgniarstwa i Instytutem Medycyny Morskiej i Tropikalnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr *Ewy Pastuszek* do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kierownik
Pracowni Technik Diagnostycznych
Wydziału Nauk o Zdrowiu UM w Lublinie
Artur Wdowiak
dr hab. n. med. Artur Wdowiak