

Dr hab. med. Aneta Słabuszewska-Jóźwiak prof. CMKP
I Klinika Położnictwa i Ginekologii
Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego
w Warszawie

OCENA PRACY DOKTORSKIEJ

Mgr Amiry Podolak

Ewaluacja wpływu zawartości mitochondrialnego DNA w zarodkach na ich rozwój i potencjał implantacyjny

Mitochondrium to organelum komórkowe, którego zasadniczą rolą jest produkcja adenozyntrifosforanu (ATP - adenosine triphosphate). ATP powstaje na drodze fosforylacji oksydacyjnej (OXPHOS) zachodzącej w wewnętrznej błonie mitochondrium i stanowi główne źródło energii niezbędnej do przeprowadzenia reakcji komórkowych. Obok procesów energetycznych mitochondria regulują proliferację, różnicowanie i apoptozę komórek. Unikatową ich cechą jest posiadanie własnego genomu dziedziczonych niezależnie od genomu jądrowego (nDNA - nuclear DNA). Mitochondrialne DNA (mtDNA) posiada 37 genów, z których 13 koduje peptydy zaangażowane w procesie fosforylacji oksydacyjnej. Mitochondrialny DNA dziedziczony jest wyłącznie z komórki jajowej. Coraz więcej badań wskazuje na rolę mtDNA w prawidłowym funkcjonowaniu komórek rozrodczych jak i zarodków, których prawidłowa implantacja wymaga znacznych ilości ATP. W przypadku zwyrodnienia oocytów można zaobserwować niską pulę mtDNA, co tłumaczyłoby ich nieskuteczne próby zapłodnienia w warunkach laboratoryjnych. Uważa się, że po zapłodnieniu komórki jajowej replikacja mtDNA następuje dopiero na etapie blastocysty a zatem pula mtDNA zawarta w oocycie musi być wystarczająca, aby podtrzymać rozwój zarodka aż do momentu implantacji. Stąd coraz częściej podnosi się rolę mtDNA w predykcji potencjału implantacyjnego zarodka w technikach wspomaganego rozrodu, choć wiele badań dostarcza niejednoznacznych informacji w tym zakresie.

Przedłożony do oceny cykl prac pod zbiorczym tytułem „Ewaluacja wpływu zawartości mitochondrialnego DNA w zarodkach na ich rozwój i potencjał implantacyjny” został wykonany pod kierownictwem Pana Profesora Krzysztofa Łukaszuka, znakomitego

specjalisty w zakresie leczenia niepłodności, wpisuje się w nurt dyskusji w zakresie badań dotyczących prawidłowej implantacji zarodka.

Celem zaplanowanych przez Doktorantkę badań była ewaluacja klinicznego znaczenia zawartości mitochondrialnego DNA w zarodkach w 3 oraz 5 lub 6 dobie po zapłodnieniu poprzez ocenę jej korelacji z ploidalnością oraz morfologią embrionów, ich potencjałem rozwojowym oraz implantacyjnym, a także wiekiem matki. Powyższe badania miały wykazać zastosowanie mitochondrialnego DNA jako niezależnego markera selekcji zarodków w procedurze zapłodnienia pozaustrojowego. Badania zostały przeprowadzone w certyfikowanym Laboratorium Genetycznym INVICTA. Preimplantacyjna diagnostyka genetyczna w kierunku aneuploidii została wykonywana przy użyciu sekwencjonowania następnej generacji (NGS) po uprzedniej amplifikacji całego genomu. Zastosowanie tych metod umożliwiło ocenę liczby odczytów w mitochondrialnym oraz genomowym DNA.

Dzieło składa się ze spójnego tematycznie zbioru 3 prac (jednej poglądowej i dwóch oryginalnych) dotyczących zastosowania oceny mitochondrialnego DNA w optymalizacji procedur zapłodnienia pozaustrojowego. Badania posiadają znaczenie zarówno podstawowe jak aplikacyjne. Wszystkie trzy artykuły zostały opublikowane w prestiżowych, międzynarodowych, indeksowanych czasopismach. Łączna wartość punktacji IF wynosi 14,605 punktów i 350 pkt. MNiSW.

Praca pt. „Mitochondrial DNA copy number in cleavage stage human embryos - impact on infertility outcome”, w której Doktorantka była pierwszym autorem, jest retrospektywnym badaniem oceniającym różnice w ilości mitochondrialnego DNA pomiędzy aneuploidalnymi i euploidalnymi blastomerami. Analizie poddano różnice w ilości mtDNA w zależności od pomyślności implantacji, budowy morfologicznej, obecności chromosomu Y w zarodku jak i wieku kobiet. Badaniem objęto 314 zarodków pochodzących od 69 par. W wyniku przeprowadzonych analiz stwierdzono istotną różnicę w zawartości mtDNA a ploidalnością zarodków. Nie wykazano związku pomiędzy ilością mtDNA a morfologią lub żywotnością zarodków, co nie daje podstaw do użycia mtDNA jako markera powodzenia procedury IVF z uwagi na brak ich powiązań z potencjałem implantacyjnym zarodków. W ocenie autorów rutynowe oznaczenia mtDNA nie są pomocne w selekcji optymalnego euploidalnego zarodka do planowanego transferu w procedurach wspomaganego rozrodu.

W artykule pt. „Does trophectoderm mitochondrial DNA content affect embryo developmental and implantation potential? “ Doktorantka była drugim autorem mającym (w świetle przedłożonych informacji) równorzędny wkład w opracowanie koncepcji, wykonanie części eksperymentalnej, opracowanie jak i interpretację uzyskanych wyników

przeprowadzonych badań. Celem tego retrospektywnego badania była ocena związku pomiędzy zawartością mtDNA w komórkach trofektodermi na etapie rozwoju blastocysty a ploidalnością zarodków i ich potencjałem implantacyjnym. Dodatkowo autorzy badali związek pomiędzy poziomem mtDNA a morfologią zarodka, płcią genetyczną embrionu oraz wiekiem matki. Badaniem objęto 716 zarodków pochodzących od 275 par. W wyniku przeprowadzonych analiz autorzy stwierdzili podwyższone poziomy mtDNA na etapie blastocysty, które są związane z aneuploidią i zmniejszonym potencjałem implantacyjnym euploidalnych zarodków. Stosunek mitochondrialnego DNA do jądrowego DNA nie korelował z wiekiem matki, płcią genetyczną zarodka ani z jego jakością. Co więcej zarodki u których wykonano biopsję 5 dnia wykazywały tendencję do prezentowania wyższych poziomów mtDNA w porównaniu z biopsjami z 6 dnia. Zadaniem autorów wartości mtDNA mogą mieć związek z potencjałem rozwojowym zarodka. Niemniej jednak, nie zaobserwowano statystycznie znamiennej korelacji analizowanego parametru z potencjałem implantacyjnym embrionów, co dowodzi niskiej wartości omawianego markera jako niezależnego narzędzia selekcji zarodków do transferu w procesie zapłodnienia in vitro. Dopełnienie cyklu stanowi praca pogładowa pt. „The role of mitochondria in human fertility and early embryo development: what can we learn for clinical application of assessing and improving mitochondrial DNA? dotycząca roli mitochondriów we wczesnej embriogenezie, w zachowaniu płodności człowieka wraz z analizą możliwości wykorzystania mitochondrialnego DNA w praktyce klinicznej. W artykule opisano podstawowe mechanizmy biologiczne związane z funkcjonowaniem mitochondriów, jak również zależności między utrzymaniem aktywności tych organelli a prawidłowym funkcjonowaniem ludzkich gamet oraz rozwojem zarodka uwzględniając czynniki warunkujące rozwój niewydolności mitochondriów.

Przedstawiona monografia zawarta jest na 41 stronach maszynopisu, posiada wszystkie zwyczajowo uwzględniane elementy strukturalne. Dwujęzyczne streszczenie, umieszczone na końcu manuskryptu, odpowiada treści rozprawy i pozwala się szybko zorientować w jej zawartości. Podobnie wykaz skrótów umieszczony na początku pracy pozwala uniknąć nieporozumień w rozumieniu treści, spełniając rolę zaawansowanego słownika. Wstęp pracy stanowi kompendium wiedzy na temat mitochondrialnego DNA, jego roli w prawidłowym funkcjonowaniu komórki jak i zarodka. Autorka zwraca uwagę na zastosowanie techniki sekwencjonowania następnej generacji, które umożliwia względną analizę zawartości mitochondrialnego DNA w zarodkach polegającą na estymacji liczby odczytów mitochondrialnego DNA w porównaniu do DNA genomowego. Powyższy

wskaźnik może wpływać na potencjał rozwojowy i implantacyjny zarodka. Na podstawie przeprowadzonych badań i ich wyników opublikowanych w 2 artykułach oryginalnych Doktorantka postawiła 6 trafnych wniosków wskazując na zależność pomiędzy zawartością mtDNA i ploidalnością zarodków oraz związku mtDNA z potencjałem rozwojowym embrionów. Zauważony trend nie uzyskał jednak istotności statystycznej stąd Doktorantka na obecnym etapie badań nie postuluje zastosowania oznaczeń mitochondrialnego DNA jako dodatkowego, niezależnego narzędzia selekcji zarodków w procedurze zapłodnienia pozaustrojowego.

Podsumowując – przedstawiony do oceny cykl prac stanowiący podstawę przewodu doktorskiego mgr Amiry Podolak pt. ” Ewaluacja wpływu zawartości mitochondrialnego DNA w zarodkach na ich rozwój i potencjał implantacyjny” spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018r. (*Dz. U. z dnia 2020r. poz. 85 z późn. zm.*)zwracam się zatem do Wysokiej Rady z wnioskiem o dopuszczenie mgr Amiry Podolak do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Biorąc pod uwagę innowacyjność przeprowadzonych badań, znakomite publikacje będące ich wynikiem, wysoki zbiorczy IF znacznie przekraczający wymagania stawiane pracom doktorskim wnioskuję o wyróżnienie pracy.

