

Prof. dr hab. n. med. Piotr Jędrzejczak

Poznań, 09 kwietnia 2024

Katedra Biologii Komórki

Uniwersytetu Medycznego

im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

ul. Rokietnicka 5D, 60-806 Poznań,

Klinika Pastelova Poznań

Pani Profesor dr hab. n. med. Edyta Paczkowska

Przewodnicząca Rady Naukowej

Dyscypliny Nauki Medyczne

Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

Recenzja rozprawy doktorskiej lekarza medycyny Tomasza Machałowskiego

**OCENA INTEGRALNOŚCI GENOMU PLEMNIKÓW I POTENCJAŁU
OKSYDACYJNO-REDUKCYJNEGO W NASIENIU ZE SZCZEGÓLNYM
UWZGLĘDNIENIEM MĘŻCZYZN NIEPŁODNYCH**

Niepłodność partnerska jest powszechnie uznawana za jedną z chorób cywilizacyjnych. Stanowi źródło niepokoju i frustracji dla co szóstej pary w wieku rozrodczym. Wraz z rozwojem i większą dostępnością do nowoczesnych metod terapeutycznych narasta potrzeba ustalenia ścisłych kryteriów pozwalających na określenie zdolności rozrodczych i kwalifikację do odpowiednich metod leczenia. Dla par zgłaszających się po pomoc ważne jest wykrycie,

gdzie leży przyczyna braku potomstwa, jakie są szanse wyleczenia i który sposób postępowania należy zastosować.

Męskie podłoże niepłodności, z uwagi na trudności diagnostyczne, stanowi nadal wielkie wyzwanie dla lekarzy zajmujących się leczeniem niepłodności. Określenie precyzyjnych kryteriów męskiej zdolności rozrodczej stanowi pilną potrzebę w medycynie rozrodu. Dotychczasowe próby podjęcia tego tematu, również w naszym kraju, nie pozwalają na oszacowanie stuprocentowej prognozy płodności męskiej. W związku z tym podjęcie przez doktoranta próby oceny męskiej zdolności do zapłodnienia w oparciu o podstawowe badania seminologiczne, poszerzone o ocenę integralności genomu plemników i potencjału oksydacyjno-redukcyjnego w nasieniu, uważam za zadanie niezwykle zasadne i aktualne. Zaproponowany tytuł rozprawy uważam za właściwy.

Przedstawiona do oceny praca doktorska liczy 64 strony, zawiera typowy układ treści, który jest czytelny i starannie wykonany. Zawarte w pracy ryciny i tabele dodatkowo podnoszą wartość pracy. Zwraca uwagę bogate i aktualne piśmiennictwo.

We wstępie autor omawia rozpowszechnienie niezamierzonej bezdzietności, koncentrując się na rosnącej roli czynnika męskiego. Wskazuje etiopatogenezę zaburzeń płodności po stronie mężczyzny. Opisuje metody diagnostyczne, jakim podlegać powinien pacjent, którego badamy z powodu niepłodności. Co należy podkreślić, autor podkreśla znaczenie oceny klinicznej w postępowaniu z pacjentem subpłodnym. W kolejnej części wstępu doktorant koncentruje się na etiopatogenezie uszkodzeń jądrowego DNA plemników. Omawia molekularne podłoże reorganizacji plemnika, procesu warunkującego zapłodnienie komórki jajowej. Zwraca uwagę na znaczenie integralności DNA gamety męskiej dla zachowania płodności. Wskazuje na rolę „nieudanej apoptozy”, która może przyczynić się do fragmentacji DNA gamety męskiej. Następnie autor szczegółowo opisuje najnowsze doniesienia dotyczące roli stresu oksydacyjnego prowadzącego do zaburzeń męskiego potencjału zapładniającego. Wskazuje na biochemiczne procesy związane z aktywnością reaktywnych form tlenu w nasieniu. W kolejnej części wstępu doktorant porusza znaczenie związków antyoksydacyjnych w nasieniu. Wskazuje jak istotne dla prawidłowej funkcji gamet męskich jest zachowanie równowagi między produkcją reaktywnych form tlenu, a działaniem ochronnym, które zapewniają składniki przeciwutleniające. Doktorant szczegółowo omawia znaczenie poszczególnych antyoksydantów enzymatycznych oraz nieenzymatycznych, które wzmacniają ich aktywność. Ponadto autor wskazuje na rolę prostasomów w neutralizacji nadmiaru wolnych rodników. We wstępie nie mógł także pominąć opisu źródeł reaktywnych form tlenu w nasieniu, co zostało

przedstawione w sposób bardzo wyczerpujący. W kolejnym etapie lekarz medycyny Tomasz Machałowski opisuje fizjologiczne znaczenie reaktywnych form tlenu w rozrodzie męskim. Na końcu tej części dysertacji doktorant omawia kliniczne konsekwencje stresu oksydacyjnego na męski potencjał rozrodczy, szczególnie koncentrując się na znaczeniu oksydacyjnych uszkodzeń DNA plemnika i ich wpływie na zaburzenia implantacji zarodka oraz na rozwój płodu.

Całość przedstawionej treści jest wnikliwa i przejrzysta, a autor we właściwy sposób zawarł najistotniejsze elementy współczesnej wiedzy dotyczące omawianych problemów, co ułatwia interpretację założeń pracy, jak i jej wyników.

Doktorant w sposób jasny i czytelny uzasadnia cele podjętych badań. Podkreśla wagę uzupełnienia klasycznych parametrów seminologicznych dla określenia prognozy płodności męskiej. Mając na uwadze, że dotychczasowe metody diagnostyczne nie są w pełni satysfakcjonujące, to próba poszukiwania nowych czynników ograniczenia męskiego rozrodu jest jak najbardziej uzasadniona. W tym względzie włączenie do badań nasienia oceny fragmentacji DNA gamet oraz oceny potencjału oksydo-redukcyjnego wydaje się jak najbardziej właściwa.

W prezentowanej pracy analizowano nasienie pochodzące z dwóch grup mężczyzn: osobników o udowodnionej płodności, którzy zostali rodzicami w okresie dwóch lat poprzedzających badanie oraz mężczyzn, u których stwierdzono niepłodność (brak uzyskania ciąży w ciągu co najmniej 12 miesięcy regularnego współżycia z partnerką w celach koncepcyjnych). Doktorant dokonał dokładnej kwalifikacji klinicznej osobników płci męskiej, co jest warte podkreślenia. Tym niemniej znacznie zwiększyło by wartość pracy dokonanie oceny partnerek mężczyzn zakwalifikowanych jako niepłodnych, gdyż pozwoliło by to wykluczyć potencjalne istnienie czynnika żeńskiego w tej grupie badanych. Analiza seminologiczna została przeprowadzona w oparciu o standardowe zasady według zaleceń Światowej Organizacji Zdrowia z 2021 roku. Ocena fragmentacji plemnikowego DNA została wykonana przy użyciu testu dyspersji chromatyny (SCD). Badanie potencjału oksydacyjno-redukcyjnego nasienia doktorant dokonał z wykorzystaniem elektrochemicznego systemu MiOXSYS® według zaleceń producenta. Opis metodyki uzupełniają zastosowane testy statystyczne.

Na podstawie swoich badań lekarz medycyny Tomasz Machałowski potwierdził występowanie różnic w większości podstawowych wyników seminologicznych pomiędzy

pacjentami płodnymi oraz zakwalifikowanymi, jako mającymi trudności z uzyskaniem ciąży u partnerki. Przy porównaniu grupy mężczyzn niepłodnych i płodnych stwierdził istotnie wyższy odsetek plemników z pofragmentowanym jądrowym DNA oraz istotnie większą wartość sORP w pierwszej z wymienionych grup. Z kolei ryzyko na wystąpienie SDF >20% i sORP >1,37 było odpowiednio 3,5 -krotnie i ponad 10 -krotnie wyższe dla mężczyzn niepłodnych wobec osobników, których partnerki urodziły dzieci w okresie ostatnich dwóch lat. Z uwagą odnotowałem fakt, że na podstawie analizy krzywej ROC doktorant wykazał, że w badanej populacji mężczyzn wartości SDF = 13% i sORP = 1,256 były liczbami granicznymi, powyżej których istniało statystyczne ryzyko niepłodności męskiej. Były to wartości zbliżone, ale nie tożsame z rekomendowanymi dla wspomnianych testów. Uzyskane wartości pola powierzchni pod krzywymi ROC (odpowiednio AUC = 0,735; oraz AUC = 0,823) wskazywały na satysfakcjonującą wartość prognostyczną testu SCD i dobrą wartość prognostyczną testu weryfikującego sORP w nasieniu. Sposób przedstawienia uzyskanych wyników jest logiczny i czytelny, zarówno w części opisowej, jak i graficznej.

W dyskusji doktorant nie tylko omawia uzyskane wyniki, ale także umiejętnie podejmuje próbę ich interpretacji. Całość jest uzupełniona interesującym z naukowego punktu widzenia porównaniem własnych obserwacji z rezultatami osiągniętymi w innych ośrodkach badawczych. Autor w sposób przekonujący udowadnia, że mężczyźni subpłodni mają wyższe ryzyko uszkodzenia chromatyny plemników oraz wyższe ryzyko stresu oksydacyjnego w nasieniu niż mężczyźni płodni, stąd w praktyce andrologicznej warto poszerzyć ocenę seminologiczną o te właśnie parametry nasienia. Tym bardziej, że nie są one skomplikowane i mogą być zastosowane w większości laboratoriów ośrodków leczenia niepłodności. Zgadzam się z autorem, że weryfikacja obu badanych parametrów wydaje się istotna ze względu na prawidłowe, spersonalizowane postępowanie terapeutyczne związane z prowadzeniem terapii antyoksydacyjnej, która ma sens, gdy jest we właściwy sposób przeprowadzana. Stąd należy podkreślić dużą wartość praktyczną przedstawionej dysertacji.

Wyciągnięte przez lek. med. Tomasza Machałowskiego wnioski są adekwatne do uzyskanych wyników i są zgodne z założonymi w pracy celami. Ponadto autor właściwie posługuje się bogatymi pozycjami piśmiennictwa, co dodatkowo podkreśla znajomość podjętego problemu i warsztatu naukowego.

Podsumowując chciałem podkreślić, iż podjęty przez lek. med. Tomasza Machałowskiego temat jest ważny we współczesnej diagnostyce niepłodności męskiej, a uzyskane nowatorskie wyniki mogą stanowić istotny wkład w pełniejszą ocenę męskiego potencjału rozrodczego.

Całość rozprawy uważam za badanie podjęte celowo, prawidłowo rozwiązane i zrozumiale przedstawione.

Na podstawie dokonanej recenzji rozprawy doktorskiej OCENA INTEGRALNOŚCI GENOMU PLEMNIKÓW I POTENCJAŁU OKSYDACYJNO-REDUKCYJNEGO W NASIENIU ZE SZCZEGÓLNYM UWZGLĘDNIENIEM MĘŻCZYŹN NIEPŁODNYCH rekomenduję Wysokiej Radzie Naukowej Dyscypliny Nauki Medyczne Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie dopuszczenie lekarza medycyny Tomasza Machałowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto stwierdzam, że spełnia ona kryteria określone w ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku o szkolnictwie wyższym i nauce, z późniejszymi zmianami.

Prof. Piotr Jędrzejczak

