

Łódź, 15.05.2024 r.

Dr hab. n. med. Renata Walczak-Jędrzejowska  
Zakład Endokrynologii Płodności  
Katedra Andrologii i Endokrynologii Płodności  
Uniwersytet Medyczny w Łodzi  
Ul. Pomorska 251  
92-213 Łódź

**Recenzja rozprawy doktorskiej lek. Tomasza Machałowskiego pt.:**  
**„OCENA INTEGRALNOŚCI GENOMU PLEMNIKÓW I POTENCJAŁU**  
**OKSYDACYJNO-REDUKCYJNEGO W NASIENIU ZE SZCZEGÓLNYM**  
**UWZGLĘDNIENIEM MĘŻCZYZN NIEPŁODNYCH”**  
**wykonanej w Zakładzie Histologii i Biologii Rozwoju**  
**Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie,**  
**pod kierunkiem naukowym Prof. dr hab. n. med. Małgorzaty Piaseckiej**  
**Promotor pomocniczy: dr n. med. Kamil Gill**

Niepłodność partnerska stanowi obecnie jeden z istotnych problemów społecznych i cywilizacyjnych. Dotyka ona od 15 do 20% par na świecie przy czym przyjmuje się, że czynnik męski odgrywa istotną rolę w około 50% jej przypadków a w około 20-30% stanowi jej jedyną przyczynę. Konwencjonalne (podstawowe) badanie nasienia, przeprowadzane wg rekomendacji Światowej Organizacji Zdrowia, jest pierwszym etapem diagnostyki zaburzeń męskiej płodności. Jednakże jego wartość predykcyjna w przewidywaniu zdolności plemników do zapłodnienia, tak w warunkach naturalnej prokreacji, jak i wspomaganiej medycznie, jest ograniczona zwłaszcza w przypadkach tzw. niepłodności idiopatycznej czy też niewyjaśnionej. Dlatego też w ostatnich latach zwraca się uwagę na znaczenie dodatkowych testów seminologicznych, których wartość predykcyjna i użyteczność kliniczna w przewidywaniu sukcesu reprodukcyjnego jest przedmiotem wielu badań. Wśród dostępnych dodatkowych testów semiologicznych uwagę zwracają testy oceniające status chromatyny plemnika oraz obecność stresu oksydacyjnego w nasieniu. Jednakże, pomimo wielu doniesień wskazujących na występowanie zaburzeń równowagi oksydo-redukcyjnej nasienia i/lub integralności chromatyny plemnika u mężczyzn niepłodnych nadal nie ma zgody co do tego, czy ocenę tych parametrów należy traktować jako rutynową praktykę w diagnostyce

idiopatycznej/niewyjaśnionej niepłodności męskiej. W tym kontekście tematyka rozprawy doktorskiej lek. Tomasza Machałowskiego jest jak najbardziej aktualna.

Chciałam także nadmienić, że podjęta przez Doktoranta tematyka badań wpisuje się w profil badań Zakładu Histologii i Biologii Rozwoju Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie, którego obecny Kierownik i równocześnie Promotor rozprawy doktorskiej Prof. dr hab. n. med. Małgorzata Piasecka jest uznanym autorytetem w badaniach dotyczących właśnie statusu chromatyny plemnika oraz obecności stresu oksydacyjnego w nasieniu i ich klinicznego znaczenia w rozrodczości.

Rozprawa ma charakter monografii naukowej, jest zredagowana prawidłowo, proporcje poszczególnych rozdziałów są zachowane i od strony formalnej nie budzi zastrzeżeń. Praca obejmuje 67 stron, 8 rycin i 7 tabel. Przedstawia klasyczny, dla tego typu prac rozdziałów zawierający następujące elementy: *Wykaz Skrótów, Wprowadzenie, Uzasadnienie i Cel Badań, Materiał i Metody, Wyniki Badań, Podsumowanie Wyników, Omówienie wyników i Dyskusja Wnioski* oraz *Piśmiennictwo*. Dodatkowo na początku pracy zamieszczone zostało *Streszczenie* (w j. polskim i angielskim) a na końcu *Spis Rycin i Tabel*. W *Aneksie*, stanowiącym końcowy element układu pracy, przedstawiona została nota biograficzna Doktoranta.

*Wprowadzenie* zostało napisane przejrzysto, w sposób uporządkowany i zawiera istotne informacje dotyczące zagadnienia będącego tematem rozprawy, które są niezbędne do zrozumienia uzyskanych wyników badań i ich interpretacji. Na początku Doktorant przedstawił w nim aktualne dane dotyczące epidemiologii, etiopatogenezy oraz diagnostyki niepłodności u mężczyzn. Wyczerpująco omówił specyficzną budowę chromatyny plemnika oraz etiopatogenezę uszkodzeń jądrowego DNA a w kolejnych podrozdziałach przedstawił główne reakcje generujące reaktywne formy tlenu i azotu i mechanizmy antyoksydacyjne występujące w nasieniu. Istotnym paragrafem jest ten poświęcony fizjologicznej roli reaktywnych form tlenu zarówno w męskim układzie płciowym (jądra, najądrza) jak i w plemnikach przebywających w żeńskich drogach rodnych podczas procesu zapłodnienia. *Wprowadzenie* kończy się opisem klinicznych konsekwencji stresu oksydacyjnego, w tym uszkodzenia DNA dla rozrodu. Doktorant zamieścił we *Wstępie* 6 rycin oraz 3 tabele, które stanowią dobrze dobrane i przemyślane uzupełnienie przedstawianych treści. **Podsumowując**, *Wprowadzenie* stanowi rzetelne omówienie poruszanych zagadnień i oparty jest o aktualną i szeroką literaturę co pozwala czytelnikowi na zapoznanie się z problemami, na których Doktorant skupił się w swojej pracy badawczej. Biorąc pod uwagę zakres obecnej wiedzy, który został zaprezentowany w tym rozdziale, zarówno z naukowego jak i klinicznego punktu widzenia, decyzja Doktoranta o kierunku prowadzonych badań jest jak najbardziej uzasadniona.

Doktorant za cel główny obrał znalezienie związku między konwencjonalną, (podstawową) analizą nasienia, integralnością genomu plemnika, potencjałem oksydo-redukcyjnym a niepłodnością męską. Przedstawione dalej 4 cele szczegółowe stanowią logiczną konsekwencję celu głównego. Wg opinii recenzenta, spośród wymienionych celów szczegółowych, na szczególną uwagę zasługuje oszacowanie ryzyka wystąpienia nieprawidłowych wyników obu testów w grupie mężczyzn niepłodnych oraz wyznaczenie dla tych testów własnych wartości predykcyjnych (referencyjnych) dla odróżnienia mężczyzn płodnych od niepłodnych.

W rozdziale *Materiał i Metody* na początku Doktorant przedstawił sposób rekrutacji uczestników badania oraz kryteria włączenia i wyłączenia do poszczególnych grup badanych: 1) mężczyzn płodnych (n=89) i niepłodnych (n=117). Dodatkowo w każdej z grup określił liczbę mężczyzn z prawidłowymi wynikami podstawowego badania nasienia (normozoospermia) oraz z zaburzeniami poszczególnych parametrów. Z jednej strony warto zauważyć, że liczebność grup, choć niezbyt wysoka, jest jak najbardziej wystarczająca do przeprowadzenia analiz statystycznych, realizacji postawionych celów i wyciągnięcia wniosków. Z drugiej strony, zdaję sobie sprawę, że namówienie, w szczególności mężczyzn płodnych, do udziału w badaniach może być trudne. **W tym miejscu prosiłabym o doprecyzowanie przez Doktoranta kryteriów włączenia uczestników badania do grupy mężczyzn niepłodnych. Czy mężczyźni ci pochodzili z niepłodnych par, w których wykluczono czynnik żeński niepłodności? Dodatkowo, chciałabym dopytać dlaczego zastosowano, jako kryterium włączenia dla mężczyzn płodnych, 2 letni okres uzyskania ciąży u partnerki a nie okres jednego roku, co byłoby w zgodzie z definicją niepłodności WHO.** Doktorant wspomina także o wypełnieniu przez uczestników badania ankiet dotyczących wywiadu medycznego i rodzinnego w których między innymi znalazły się pytania o aktualne i przebyte choroby, farmakoterapię, nawyki żywieniowe czy też używki. Niestety nie do końca jasne jest czy dane te służyły jako kryteria włączenia/wyłączenia uczestników z badania czy miały jakiś inny cel. W wynikach brak jest odniesień (np. porównań między grupami) dotyczących zebranych danych tj. aktualne chorób, przyjmowane leki czy stosowane przez uczestników używki. W kolejnych częściach rozdziału *Materiały i Metody* Doktorant szczegółowo i merytorycznie poprawnie opisał zastosowane analizy seminologiczne – podstawowe badanie nasienia wg rekomendacji WHO z roku 2021, test dyspersji chromatyny (tzw. Halo-test), oceniający fragmentacje DNA plemnika oraz ocenę potencjału oksydo-redukcyjnego z wykorzystaniem systemu MIOXYS. Na koniec rozdziału opisane zostały zastosowane metody statystyczne, których wybór nie budzi

wątpliwości recenzenta, **choć mam pytanie czy Doktorant rozważał wykonanie dodatkowo analizy korelacji między parametrami konwencjonalnej oceny nasienia i wynikami testów dodatkowych.**

Wyniki badań przedstawione zostały w 4 tabelach i na 2 rycinach a ich opis jest przejrzysty i wyczerpujący i wykazuje prawidłową chronologię, która jest czytelna i zrozumiała. Badane parametry zostały przedstawione w postaci mediany, wartości minimalnej i maksymalnej oraz średniej i odchylenia standardowego. Analiza porównawcza grup, czego można było się spodziewać, wykazała u mężczyzn niepłodnych gorszą jakość parametrów nasienia oraz DNA plemników jak i wyższą wartość potencjału oksydo-redukcyjnego, wskazującego na występowanie stresu oksydacyjnego w nasieniu. **W tym miejscu, z czystej ciekawości, chciałabym zapytać Doktoranta czy zaobserwował on nieprawidłowe wyniki testów dodatkowych w grupie mężczyzn płodnych z normozoospermią?** W dalszej części rozdziału Autor wykazał statystycznie wartość predykcyjną (referencyjną) analizowanych testów dodatkowych, obliczył czułość i specyficzność oraz określił iloraz szans na wystąpienie wyników nieprawidłowych tych testów w badanych grupach. Wg opinii recenzenta wyniki te mają charakter praktyczny i istotne implikacje kliniczne i wskazują na potrzebę wprowadzenia tych badań do rutynowej diagnostyki zaburzeń męskiej płodności. Warto tutaj podkreślić, że nieprawidłowe wyniki wykorzystanych testów dodatkowych są często efektem działania tzw. czynników modyfikowalnych czy zaburzeń w męskim układzie płciowych, które można leczyć, co daje możliwość ich poprawy. Dodatkowo, w ostatnich rekomendacjach WHO odnośnie badania nasienia, w których opisane są także wykorzystane w dysertacji testy dodatkowe, nie wskazuje się wartości referencyjnych dla nich, przeciwnie rekomenduje się wyznaczenie przez każde laboratorium swoich własnych wewnętrznych wartości referencyjnych. Ty samym można uznać, że wyniki uzyskane przez Doktoranta stanowią właśnie próbę wyznaczenia tych wartości.

**Podsumowując,** wyniki zastały dobrze udokumentowane i poprawnie zaprezentowane. Wysoko oceniam ich praktyczny charakter i kliniczną użyteczność. Warto zaznaczyć, że w literaturze jest niewiele podobnych opracowań, w których równocześnie analizowano obecność stresu oksydacyjnego jak i jakość DNA plemnika w grupach mężczyzn płodnych i niepłodnych. Tak więc wyniki doktoratu stanowią nowy wkład do wiedzy na temat zaburzeń męskiej płodności i ich diagnostyki.

W rozdziale *Dyskusja* Autor w sposób kompetentny, wnikliwy ale i krytyczny omawia uzyskane wyniki dokonując porównania z innymi wynikami badań opublikowanych w renomowanych czasopismach. Widoczna jest tutaj umiejętność obiektywnej oceny własnych

wyników i logicznego przeprowadzania wywodu naukowego ale także świadomość ewentualnych ograniczeń przeprowadzanych badań. W oparciu o uzyskane wyniki Doktorant wyprowadził 4 wnioski, które mają charakter poznawczy jak i praktyczny oraz w pełni odpowiadają na postawione cele.

Autor w swojej rozprawie powołuje się na 219 pozycji piśmiennictwa. Głównie są to anglojęzyczne prace oryginalne, związane z tematyką prowadzonych przez Doktoranta badań, przy czym większość stanowią publikacje z ostatnich 10 lat. Lista publikacji dowodzi znajomości przez Doktoranta literatury przedmiotu oraz umiejętności krytycznej oceny i doboru źródeł.

Tekst rozprawy napisany jest poprawnym specjalistycznym językiem, choć Doktorant nie ustrzegł się drobnych błędów językowych, edycyjnych czy nieścisłości, które jednak w żaden sposób nie zmniejszają wartości merytorycznej przedstawionej mi do oceny dysertacji.

Streszczenia napisane są w sposób typowy dla rozpraw doktorskich i zawierają najważniejsze elementy pracy.

#### Podsumowanie

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska lek. Tomasza Machałowskiego pt.: **„Ocena integralności genomu plemników i potencjału oksydacyjno–redukcyjnego w nasieniu ze szczególnym uwzględnieniem mężczyzn nieplodnych”**, pomimo przedstawionych przeze mnie drobnych uwag, jest wartościowa i prezentuje walory nie tylko poznawcze ale i praktyczne. Niewątpliwie stanowi oryginalny i samodzielny dorobek naukowy Autora. Wskazuje także na umiejętność posługiwania się przez Niego warsztatem naukowym, a umiejętność stawiania hipotez i ich rozwiązywania oraz krytycznej interpretacji uzyskanych wyników dowodzi Jego dojrzałości naukowej.

Na tej podstawie stwierdzam, że rozprawa spełnia warunki określone w artykule 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z póź. zm.). Mam zaszczyt wnieść do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Medycznej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie o dopuszczenie Pana lek. Tomasza Machałowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego i nadanie stopnia naukowego doktora w dyscyplinie nauki medyczne.

Dr hab. n. med. Renata Walczak-Jędrzejowska

Dr hab. n. med.  
Renata Walczak-Jędrzejowska  
Zakład Endokrynologii Płodności  
Katedra Andrologii i Endokrynologii Płodności  
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

