

Kierownik Oddziału Ginekologii
i Ośrodka Medycznie Wspomaganej
Prokreacji – Szpital Gameta Łódź
ul. Rudzka 34/36
95-030 Rzgów k/Łodzi
Prof. nadzw. PWSZ w Płocku

Recenzja rozprawy doktorskiej

Pani Urszuli Cwaliny

**pt. Analiza wpływu czynników morfokinetycznych na potencjał
rozwojowy zarodków, ze szczególnym uwzględnieniem
zjawiska Direct Unequal Cleavages**

Niepłodność jest uznana przez Światową Organizację Zdrowia za chorobę społeczną. W zależności od przyczyn może być leczona różnymi metodami. Spośród nich najbardziej popularne są metody medycznie wspomaganej prokreacji. Według ostatnich danych liczba procedur wzrasta rok do roku o ponad 10% a obecnie w Europie wykonuje się ponad 1 milion prób pozaustrojowego zapłodnienia rocznie. Od 1978 roku na Świecie urodziło się dzięki tej metodzie ponad 8 milionów dzieci a w 2010 roku za opracowanie leczenia niepłodności metodą invitro Robert Edwards otrzymał nagrodę Nobla.

Przez ponad 40 lat procedura pozaustrojowego zapłodnienia przyczyniła się również do lepszego poznania fizjologii zapłodnienia oraz wczesnych etapów rozwoju zarodków. Jednoznacznie wykazano, że zarodki różnią się od siebie potencjałem rozwojowym. Konsekwencją tego są różnice w szansach na ciążę, ryzyku straty ciąży oraz szansach na urodzenie zdrowego dziecka. W związku z tym nadal poszukiwane są metody, które w sposób najmniej inwazyjny mogą przyczynić się do wyboru prawidłowego zarodka. Ma to na celu zwiększenie szansy na ciążę a dzięki temu

skrócenie czasu i kosztów leczenia oraz co najważniejsze zminimalizowania stresu i ryzyka powikłań u pacjentów.

Od lat do tego celu wykorzystuje się m. in. tradycyjną mikroskopową ocenę morfologii zarodka, przedimplantacyjne testowanie zarodków. Podjęto również próby zastosowania genomiki, proteomiki i metabolomiki. Niestety żadna z tych metod nie jest w stanie określić w 100% który zarodek może przynieść upragniony sukces w postaci narodzin dziecka. Prowadzi to często do niepotrzebnych transferów zarodków lub mrożenia i przechowywania zarodków, które w przyszłości nie dadzą gwarancji sukcesu.

Tym bardziej interesujący jest temat dysertacji, która została mi przedstawiona do oceny przez Wysoką Radę Wydziału Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

Praca składa się ze 158 stron i została podzielona na 11 rozdziałów zgodnie z przyjętymi zasadami. Na początku doktorantka zamieściła czytelny spis treści. Praca kolejno zawiera: wstęp, cel pracy, materiał i metodykę, wyniki, dyskusję, wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim, piśmiennictwo oraz spisy tabel i rycin.

Wstęp

We wstępie przedstawiono szczegółowo problemy, które są przyczyną nieprawidłowego rozwoju zarodka ludzkiego. W związku z tym, że potencjał rozwojowy zarodka jest związany z jakością zarówno żeńskich jak i męskich komórek rozrodczych doktorantka opisała proces spermatogenezy i oogenezy. W kolejnym punkcie opisane zostały kolejno proces zapłodnienia, bruzdkowania, kompaktacji i tworzenia blastocysty. Należy zaznaczyć, że opisany proces zapłodnienia trwa od kilku do kilkunastu godzin a nie jak opisała doktorantka około 5-7 dni i nie zachodzi w jajowodzie i macicy tylko w samym jajowodzie.

W dalszej części wstępu opisano proces implantacji oraz zasady oceny potencjału rozwojowego zarodka podczas leczenia niepłodności metodą pozaustrojowego zapłodnienia. Przedstawiono tradycyjny sposób oceny rozwoju zarodka, inwazyjne metody testowania genetycznego zarodków oraz coraz bardziej

popularną metodę „poklatkową” tzw. time lapse. Doktorantka słusznie zwróciła uwagę na to, że metoda time lapse cechuje się najmniejszą z spośród dostępnych metod inwazyjnością dla zarodków. Dodatkowo ta metoda umożliwia bardzo dobrą dokumentację rozwoju zarodka oraz późniejsze analizy podziału blastomerów. Informacje te mogą być przydatne zarówno w badaniach naukowych jak i w codziennej praktyce klinicznej.

Następnie Pani Urszula Cwalina opisuje epidemiologię i etiologię niepłodności oraz zasady leczenia zgodnie z medycyną opartą o dowody naukowe. Osobny punkt wstępu jest przeznaczony na opis morfokinetyki zarodka a w szczególności na zjawisko nagłego podziału blastomeru zarodka na kilka blastomerów potomnych - zjawisko DUC, *ang. Direct Unequal Cleavages*.

Cel pracy

Doktorantka założyła w swojej pracy cele o bardzo ważnym znaczeniu nie tylko naukowym ale również praktycznym. Przeprowadzone badania miały odpowiedzieć na pytania czy szczegółowa ocena morfokinetyki zarodka może być przydatna przy wyborze do transferu zarodka o najwyższym potencjale rozwojowym. Odpowiedź na to pytanie Pani Urszula Cwalina postanowiła zrealizować poprzez niżej wymienione odpowiednio sformułowane cele:

- 1) Ocena wpływu czynników morfokinetycznych na fakt rozwoju zarodka do stadium blastocysty.
- 2) Ocena wpływu czynników morfokinetycznych na fakt stwierdzenia ciąży biochemicznej i klinicznej.
- 3) Ocena częstości występowania zjawiska DUC oraz scharakteryzowanie przypadków, w których DUC występuje.
- 4) Porównanie przypadków, w których występuje DUC z przypadkami, w których DUC nie występuje.
- 5) Wskazanie i opisanie zależności pomiędzy czynnikami morfokinetycznymi, występowaniem zjawiska DUC oraz potencjałem rozwojowym zarodków.

Materiał i metody

Retrospektywnym badaniem objęto dużą liczbę danych bo aż 4030 przypadków w których doszło do zapłodnienia zgromadzonych w Centrum Leczenia Niepłodności Kriobank w Białymstoku w latach 2012-2017. Na prowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej.

Doktorantka szczegółowo opisuje dobrze dobraną pod względem klinicznym i statystycznym metodę badawczą. Zamieszczenie w tym rozdziale tabel i rycin przedstawiających parametry morfokinetyczne oraz schematu podziału blastomerów w czasie jest cennym dodatkiem, który może ułatwiać analizę tekstu.

Opisując metodologię wykrywania przypadków DUC Pani Urszula Cwalina słusznie zwróciła uwagę na pewne ograniczenia metodologiczne wynikające ze skomplikowanej oceny zjawiska DUC.

Wyniki

Wyniki zostały opisane w 4 podrozdziałach i 12 punktach. Dodatkowo zostały czytelnie przedstawione w postaci dużej liczby 76 rycin i 40 tabel. W pierwszym podrozdziale opisano analizowane grupy. W sposób wystarczający został uzasadniony powód dla którego zastosowano dwa sposoby klasyfikacji występowania zjawiska DUC.

Następnie kolejno opisano wyniki analizy:

- potencjału rozwojowego zarodków do stadium blastocysty,
- potencjału rozwojowego zarodków które zostały przeniesione do macicy,
- potencjału rozwojowego zarodków z wykorzystaniem metod Data Mining. Opisano tutaj reguły asocjacyjne razem z siecią w/w reguł oraz analizę korespondencji z mapami percepcji.

Dyskusja

Dyskusja została przeprowadzona wyczerpująco i rzetelnie. Doktorantka szczegółowo przeanalizowała otrzymane wyniki a następnie porównała je z aktualnie

dostępnym piśmiennictwem, w którym zjawisko DUC nie jest niestety dobrze usystematyzowane. Konsekwencją tego odsetek występowania tego zjawiska może różnić się pomiędzy publikacjami.

Należy zauważyć, że doktorantka w tym rozdziale opisała IVF jako najskuteczniejszą metodę leczenia niepłodności. Jest to stwierdzenie prawdziwe jednak celem doprecyzowania można by dodać, że w przeliczeniu na cykl (próbę) leczenia i tylko wtedy, gdy są do tej metody wskazania medycznie.

Wnioski

Przedstawione wnioski są zgodne z celami pracy i wynikają z przeprowadzonych badań. Doktorantka przedstawiła kolejno osiem wniosków:

- 1) Zjawisko jakim jest DUC występuje stosunkowo często, można je zaobserwować u ponad 20% zapłodnionych zarodków.
- 2) Nie zachodzi związek pomiędzy wiekiem matki i obecnością zjawiska DUC.
- 3) Zarodki, w przypadku których zaobserwowano zjawisko DUC charakteryzują się gorszym potencjałem rozwojowym w porównaniu do zarodków, u których anomalia ta nie występuje. Istotnie rzadziej osiągają stadium blastocysty, a ich transfer istotnie rzadziej prowadzi do ciąży biochemicznej i klinicznej.
- 4) Odsetki zarodków osiągających stadium blastocysty i dających ciążę są szczególnie niskie w grupie DUC-1. Wystąpienie zjawiska DUC w pierwszej rundzie częściej wskazuje na gorsze rokowania niż wystąpienie tego zjawiska w późniejszej rundzie podziałów.
- 5) W przypadku obserwowania DUC dużo częściej można stwierdzić niepożądane własności blastomerów takie jak: nierówne rozmiary, wysoki poziom fragmentacji cytoplazmy oraz wielojądrowość. Jest to szczególnie widoczne w grupie DUC-1.
- 6) Przypadki DUC (szczególnie DUC-1) różnią się pod względem ilościowych parametrów morfokinetycznych w porównaniu do Brak DUC. Charakterystyczne zjawiska takie jak wyrzut drugiego ciała kierunkowego, pojawienie się, czy zanik przedjądrzy, a także osiągnięcie stadium dwublastomerowego zachodzą tu później.

- 7) Analizując parametry morfokinetyczne wyodrębnienie przypadków DUC jest konieczne, aby można było posługiwać się względnymi miarami takimi jak np. cc2, cc3. Nieuwzględnienie tego zjawiska skutkować może błędną interpretacją uzyskanych wyników, a nawet błędnymi wnioskami.
- 8) Zjawisko jakim jest DUC z pewnością powinno być przedmiotem dalszych badań. Należy szukać przyczyn jego występowania, sposobów bezinwazyjnego wykrywania, a także skutków, jakie niesie w kontekście rozwoju zarodka.

Streszczenie

Streszczenie w języku polskim i języku angielskim umożliwia szybkie zorientowanie się w temacie, celach, metodyce, wynikach oraz wnioskach wynikających z pracy.

Piśmiennictwo

Rozdział ten zawiera prawidłowo dobraną, dość obszerną bibliografię składającą się ze 102 pozycji piśmiennictwa uporządkowanych zgodnie z kolejnością zamieszczenia w tekście.

Podsumowanie recenzji

Zjawisko nagłego podziału blastomeru zarodka na kilka blastomerów potomnych (DUC) jest istotnym czynnikiem predykcyjnym dalszego rozwoju zarodka. Mam nadzieję, że umiejętności jakie posiada doktorantka takie jak stosowanie nowoczesnych metod statystycznych oraz właściwe gromadzenie danych będą w przyszłości owocowały dalszymi równie ciekawymi osiągnięciami naukowymi.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska w mojej opinii spełnia warunki stawiane rozprawom na stopień doktora nauk medycznych zgodnie z aktualnie obowiązującym w prawem. Na tej podstawie pozwalam sobie przedstawić Wysokiej Radzie Wydziału Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku wniosek o dopuszczenie Pani Urszuli Cwaliny do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Michał Rodzian