

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

Recenzja rozprawy doktorskiej

Pani Doroty Jankowskiej

**pt. Wzorce czasów pierwszych podziałów rozwijających się
zarodków w kontekście ich potencjału rozwojowego**

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 9 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, 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 złożona fizjologia zarodków oraz niedoskonałości stosowanych metod powodują, że 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 szansy na urodzenie dziecka.

Tym bardziej interesujący jest temat badań podjętych przez Panią Dorotę Jankowską. Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska składa się ze 148 stron i została podzielona na 11 rozdziałów zgodnie z przyjętymi zasadami. 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 dane na temat epidemiologii i etiologii niepłodności. W akapicie opisującym metody leczenia doktorantka nie uniknęła niewielkich błędów, które prawdopodobnie wynikają z faktu braku doświadczenia klinicznego. Pomimo tego, że tak drobne błędy nie wpływają na jakość merytoryczną pracy to sugeruje naniesienie następujących poprawek.

1.1.

- stymulacja jajczkowania to również podanie gonadotropin;
- w farmakoterapii zaburzeń spermatogenezy nie stosuje się testosteronu ponieważ prowadzi to do zahamowania sekrecji gonadotropin i w efekcie zahamowania spermatogenezy;
- antyoksydanty są stosowane jako tzw. „terapię dodatkowe/pomocnicze” bez ewidentnie udowodnionej skuteczności w zwiększeniu szansy na żywe urodzenie w porównaniu do efektu placebo,

W części 1.2.1 sugeruję:

Usunięcie zdania:

„Jednak właściwości jakie posiadają wówczas plemniki mogłyby najędrzu zaszkodzić, wobec czego są hamowane na drodze dekapacytacji”.

....”płynnej zawiesiny męskich gamet w osoczu”....

Poprawę zgodnie z aktualnymi zakresami referencyjnymi WHO dla parametrów nasienia:

- „*wydzielanej podczas wytrysku, znajduje się mniej więcej 1 mln plemników*

Jednoznaczne opisanie lub usunięcie:

„Czas ich przeżycia zależy od wielu warunków (przede wszystkim od środowiska pochwy). Gdy są optymalne wynosi nawet 2 do 4 dni”

Ponieważ na stronie 7 są inne wartości.

Opisane w ostatnim akapicie rozdziału 1.2 przyczyny braku implantacji nie zostały wyjaśnione precyzyjnie. Proponuje ponowne przeanalizowanie tej części wstępu zwracając uwagę na fakt, że główna przyczyna zatrzymania rozwoju zarodka we wczesnych etapach embriogenezy oraz w okresie około implantacyjnym są czynniki genetyczne wynikające z nieprawidłowości w oocytach lub/i plemnikach.

W części 1.3

- Obecnie wykonuje się IUI domaciczne. Doszyjkowe inseminacje nie są już wykonywane.

- Stwierdzenie „*technika przeciwdziałania niepłodności jest również IVF*” wymaga poprawki.

- IVF nie polega na: „*na zapłodnieniu poza organizmem kobiety, w warunkach laboratoryjnych, jednej bądź kilku komórek jajowych, które następnie umieszczone są w jamie macicy*”.

Do macicy przenoszony jest prawie zawsze 1 zarodek a nie „komórki jajowe”

- Nie przeprowadza się już tzw. badań wrogości śluzu szyjkowego

W dalszej części wstępu opisano nowoczesne procesy obserwacji rozwoju zarodka. Kolejne punkty wyjaśniają szczegółowo zasady eksploracji wielowymiarowych danych z wykorzystaniem metod Data Mining. Ta część wstępu, która jest uzupełniona wieloma schematami może być dobrym kompendium wiedzy na temat opisywanych metod statystycznych.

Cel pracy

Doktorantka założyła w swojej pracy cele o ważnym znaczeniu nie tylko naukowym i klinicznym. Przeprowadzone badania miały odpowiedzieć na pytanie: Czy metody z grupy Data Mining i algorytmy sztucznej inteligencji mogą być pomocne w prognozowaniu, szansy na rozwój zapłodnionej komórki jajowej do zarodka w stadium blastocysty.

Pani Dorota Jankowska postanowiła odpowiedzieć na powyższe pytania poprzez niżej wymienione odpowiednio sformułowane cele szczegółowe:

1. Ustalenie, które z parametrów morfokinetycznych, opisujących rozwój zarodków, mają istotny wpływ na uzyskanie przez nie stadium blastocysty.
2. Przygotowanie reguł dotyczących dynamiki podziałów komórkowych, implikujących z dużym prawdopodobieństwem sukces bądź porażkę w rozwoju zarodka do etapu blastocysty.
3. Identyfikacja klas zarodków o zbliżonych wzorcach podziałowych, z wykorzystaniem różnych technik analizy danych zaliczanych do grupy Data Mining, czy algorytmów sztucznej inteligencji.
4. Ocena przygotowanych skupień zarodków pod względem ich potencjału rozwojowego.
5. Ustalenie struktury podobieństwa skupień pod względem właściwości morfokinetycznych, zwłaszcza tych, które nie były wykorzystane w procesie budowy modeli klasyfikatorów.

Materiał i metody

Retrospektywnym badaniem objęto dużą liczbę danych - 4050 przypadków zapłodnienia zgromadzonych w Centrum Leczenia Niepłodności Kriobank w Białymstoku w latach 2012-2015. 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 schematy podziału blastomerów w czasie jest cennym dodatkiem, który może ułatwiać analizę tekstu.

Wyniki

Wyniki zostały opisane w 6 podrozdziałach. Dodatkowo zostały czytelnie przedstawione w postaci 20 rycin i 44 tabel.

Dyskusja

Dyskusja została przeprowadzona wyczerpująco i rzetelnie. Doktorantka szczegółowo przeanalizowała otrzymane wyniki a następnie porównała je z aktualnie dostępnym piśmiennictwem zarówno z zakresu embriologii klinicznej jak i aspektów klinicznych transferu zarodka do macicy.

W ostatnim akapicie dyskusji Doktorantka stwierdza że: *„Na obecną chwilę nie wydaje się aby technologia time-lapse była gotowa całkowicie zastąpić inwazyjne, przedimplantacyjne testy genetyczne w ocenie potencjału rozwojowego zarodka”*. Otóż zwiększająca się ilość danych na temat ograniczeń diagnostyki przedimplantacyjnej skutkuje tym, że metoda ta jest obecnie uznawana za nierekomendowaną lub co najmniej kontrowersyjną. Dlatego też równolegle muszą być poszukiwane inne metody diagnostyczne zarodków które poprawią skuteczność oceny ich potencjału rozwojowego. Należą do nich m. in. badania przeprowadzone przed Doktorantką.

Wnioski

Przedstawione wnioski są zgodne z celami pracy i wynikają z przeprowadzonych badań. Doktorantka przedstawiła kolejno 9 wniosków:

1. Zarodki, które osiągnęły postać blastocysty i nierozwinięte do tego stadium, różnią się istotnie statystycznie pod względem większości bezwzględnych i względnych parametrów morfokinetycznych (z wyjątkiem czasów t5 i t9). Fakt formowania się blastocysty zależy także istotnie statystycznie od własności morfologicznych, możliwych do ustalenia przez embriologa przy tradycyjnej, statycznej ocenie.

2. Podstawowa analiza statystyczna nie wskazała na istnienie konkretnych, pojedynczych parametrów morfokinetycznych, które determinowałyby rozwój zarodków do stadium blastocysty. Pozwoliła ona jedynie wykazać, że zarodki, które uformowały blastocystę, mają przeciętnie krótsze i mniej rozproszone czasy kolejnych podziałów, niż zarodki, które zatrzymały się w rozwoju na wcześniejszym etapie.
3. Metody analizy statystycznej należące do grupy Data Mining dały szansę efektywnego wykrywania skupień zarodków o zbliżonych wzorcach podziałowych. Utworzone klasy różnią się istotnie statystycznie potencjałem zgromadzonych w nich zarodków do osiągnięcia stadium blastocysty.
4. Obserwacja przygotowanych skupień pozwoliła lepiej zrozumieć naturę badanego procesu, wychwycić pewne systematyczne współzależności i wskazać te cechy dynamiki podziałów, które determinują, czy też znacząco wpływają na rozwój zarodka do stadium blastocysty.
5. Sprzyjającym dla sukcesu w rozwoju zarodka jest zachodzenie kolejnych podziałów w określonych „okienkach” czasowych; czasy te nie mogą być zbyt krótkie (ponieważ nie byłyby w stanie zająć wszystkie procesy, niezbędne do ukończenia pełnego cyklu komórkowego) ani zbyt długie (świadcząłoby to o obecności anomalii zaburzających rozwój zarodka). Bardzo istotna jest również synchronizacja podziałów komórkowych (s2 oraz s3). Jeśli przebiega dynamicznie to zwiększa szansę na uzyskanie przez zarodek stadium blastocysty.
6. Procedura identyfikacji skupień zarodków o podobnych schematach osiągnięcia kolejnych etapów rozwoju pozwoliła wskazać klasy bardzo dobrze rokujących przypadków (z odsetkiem sukcesów na poziomie nawet ponad 80%). Niezadowolająco poradziła sobie jednak z rozpoznawaniem grup zarodków, które zatrzymują swój rozwój jeszcze przed uzyskaniem stadium blastocysty. Klasy przypadków najslabiej rokujących charakteryzowały się wciąż sporym (około 30-40%) odsetkiem uformowanych blastocyst. Niezbędne wydaje się więc kontynuowanie poszukiwania warunków bardziej jednoznacznie determinujących niepowodzenie rozwoju zapłodnionej komórki jajowej.
7. Eksploracja danych morfokinetycznych, z wykorzystaniem tzw. metod Data Mining „z nauczycielem” , umożliwiła sformułowanie konkretnych zasad, których spełnienie

z wysokim prawdopodobieństwem (nawet ponad 90%) prowadzi do osiągnięcia przez zarodek stadium blastocysty.

8. Dzięki przeprowadzonym analizom możliwe stało się wskazanie optymalnych, z punktu widzenia rozwoju zarodka, zakresów wartości cech morfokinetycznych.

9. Parametry świadczące o dynamice rozwoju zarodka rozpatrywane osobno mają niską moc klasyfikacyjną. Jednoczesna analiza cech morfokinetycznych dała szansę przygotowania dobrej jakości klasyfikatorów (pole pod krzywą ROC na poziomie nawet ponad 0,8). Stanowią one zestaw reguł różnicujących zarodki ze względu na ich potencjał rozwojowy. Na ich podstawie możliwe jest prognozowanie z dużą skutecznością, czy nowo zapłodnione komórki jajowe mają szansę uzyskać postać blastocysty.

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 108 pozycji piśmiennictwa uporządkowanych zgodnie z kolejnością zamieszczenia w tekście.

Podsumowanie recenzji

Próba identyfikacji dodatkowych nieinwazyjnych metod wyboru zarodków do transferu jest istotnym wkładem badawczym w leczenie niepłodności i embriologię kliniczną. Mam nadzieję, że umiejętności doktorantki w połączeniu z doświadczeniami klinicznymi będą w przyszłości miały istotny wpływ na rozwój naszej wiedzy.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska w mojej opinii spełnia warunki stawiane rozprawom na stopień doktora nauk medycznych zgodnie z aktualnie obowiązującym w prawem.

Pozwalam sobie przedstawić Wysokiemu Senatowi Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku wniosek o dopuszczenie Pani Doroty Jankowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

*Michał Dolewał*⁷