

Recenzja 1

Poznań, 26.09.2023

Ocena rozprawy doktorskiej Pani lek. Edyty Budzyńskiej

Tytuł rozprawy: *Wybrane czynniki genetyczne w niepłodności męskiej*

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani lek. Edyty Budzyńskiej została przygotowana pod kierunkiem Prof. dr hab. n. med. Macieja Borowca w Katedrze Genetyki Klinicznej i Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Praca dotyczy wybranych genetycznych przyczyn niepłodności męskiej, stanowiącej istotny populacyjnie problem medyczny. Tym istotniejszy, że stajemy wobec faktu rosnącego odsetka par bezskutecznie starającego się o ciążę. Według różnych danych, obecnie odsetek par z niepłodnością konsultowanych i diagnozowanych w poradni genetycznej w Europie Zachodniej i USA wynosi od 15% do nawet 20%. Niepłodność męska odpowiada z ok. 50% przyczyn niepłodności małżeńskiej i znanych jest wiele genetycznych czynników sprawczych, które można identyfikować w rutynowych badaniach genetycznych. Do klasycznych, najczęściej wykrywanych nieprawidłowości genetycznych należą aberracje chromosomowe, w tym liczbowe (np. zespół Klinefeltera), translokacje i inwersje chromosomowe oraz kariotyp 46,XX u mężczyzn z zaburzeniami rozwoju płci. Innymi, względnie często identyfikowanymi nieprawidłowościami genetycznymi są mikrodelecje regionu AZF oraz warianty patogenne genu *CFTR*. Do trzech wspomnianych powyżej i rutynowo badanych genetycznych przyczyn niepłodności męskiej, dołożyć można stale rosnącą grupę zaburzeń monogenowych. Dzięki użyciu nowoczesnych metod sekwencjonowania DNA, czyli sekwencjonowania następnej generacji (NGS od ang. *next generation sequencing*) poznajemy ciągle nowe, choć już względnie rzadkie jednogenowe przyczyny niepłodności. Słusznie zatem Autorka podjęła się badań nad powyższą problematyką, uzasadniając to powodami poznawczymi, jak również względami praktycznymi, mającymi potencjalnie znaczenie dla diagnostyki i opieki nad pacjentami, w tym poradnictwa genetycznego i planowania odpowiedniej strategii leczenia niepłodności.

Przedstawiona do oceny dysertacja ma typowy dla rozpraw doktorskich układ redakcyjny. Zawiera 84 strony maszynopisu (4 strony spisu treści i skrótów oraz 77 stron tekstu pracy), z tradycyjnym podziałem na wstęp, cele pracy, materiały i metody, wyniki badań, dyskusję, wnioski, streszczenia w języku polskim i angielskim, piśmiennictwo oraz spis tabel i rycin. W pracy zawarto 13 tabel i 11 rycin oraz 113 pozycji piśmiennictwa.

Dysertację otwiera wykaz stosowanych w pracy skrótów, po którym następuje spis treści. We wstępie Doktorantka omówiła definicję, przyczyny występowania oraz epidemiologię niepłodności męskiej, skupiając się w szczególności na genetycznych przyczynach zaburzenia. Następnie opisała najczęstsze aberracje chromosomowe, skutkujące niepłodnością, by omówić mikrodelecyjne i monogenowe przyczyny zaburzenia. W formie tabelarycznej Autorka zestawiała jednostki chorobowe skutkujące niepłodnością i nieprawidłowościami budowy plemników, co

stanowi cenny i interesujący przegląd aktualnego piśmiennictwa z tej tematyki. Na końcu tej części pracy scharakteryzowano gen *MTHFR*, który występuje w populacji w trzech różnych wariantach, a którego powiązanie z patologiami rozrodu człowieka lub innymi chorobami genetycznymi jest wątpliwe, ze względu na brak jednoznacznych danych lub wzajemnie wykluczające się wyniki badań. Lektura wstępu dowodzi, że Autorka ma dobre rozeznanie w omawianych zagadnieniach, a tym samym dobre przygotowanie teoretyczne do realizacji badań. Jako genetyk kliniczny z wieloletnim doświadczeniem i praktyką, Doktorantka z całą pewnością konsultowała i diagnozowała wiele par z niepłodnością, tak więc podjęcie tematu rozprawy doktorskiej wydaje się naturalną konsekwencją Jej działalności lekarskiej. Dobrze, że praca kliniczna Autorki znalazła swoje podsumowanie w postaci niniejszej dysertacji.

Dwa cele pracy zostały jasno sformułowane. Autorka opisała pierwszy cel, obejmujący ocenę częstości występowania aberracji chromosomowych, mikrodelecji regionu AZF w chromosomie Y i najczęstszych wariantów patogennych w *CFTR* u mężczyzn z niepłodnością pierwotną. Cel ten nie budzi wątpliwości, gdyż zmiany patogenne dotyczące chromosomów, regionu AZF oraz genu *CFTR* stanowią udokumentowane i nie budzące wątpliwości przyczyny niepłodności męskiej. Drugim celem była natomiast analiza częstości występowania wariantów c.665C>T oraz c.1298A>C genu *MTHFR* w grupie pacjentów z niepłodnością i nieprawidłowym stężeniem plemników w nasieniu w stosunku do zdrowych mężczyzn. W mojej ocenie w pracy brakuje dostatecznego uzasadnienia wyboru genu *MTHFR* do badań porównawczych. Uzasadnienie to powinno być poparte szerszym przeglądem piśmiennictwa medycznego oraz szczegółowym omówieniem biologicznej funkcji genu *MTHFR* i kodowanego przez gen białka w procesie spermatogenezy lub szerzej – płodności męskiej. Uzasadnienie wyboru genu *MTHFR* wydaje się zbyt zdawkowe, tym bardziej, że Autorka sama słusznie przyznaje, iż dane z piśmiennictwa są bardzo niejednoznaczne i sprzeczne. Co więcej, warianty łagodne (dawniej polimorfizmy) *MTHFR* występują w różnych populacjach z bardzo wysoką częstością, a w Polsce częstości obu badanych wariantów *MTHFR* wynoszą po ok. 30%, przy częstości allelu referencyjnego (dawniej wt), wynoszącej ok. 40%. Gdyby nosicielstwo badanych zmian obniżało choćby w niewielkim stopniu płodność nosicieli, zmienione allele ulegałyby samoeliminacji z populacji z pokolenia na pokolenie. Tymczasem są one obecne wśród wszystkich ras z wysoką częstością, co oznacza, że efekt założycielski miał miejsce wiele tysięcy lat wstecz. Logicznym jest zatem, że ich wpływ na płodność populacji jest znikomy lub wręcz żaden. Dlatego nie znajduję wystarczającego uzasadnienia dla realizacji drugiego z celów badawczych pracy.

W rozdziale Materiał i Metodyka Doktorantka opisała grupę badaną nr 1, którą stanowiło 1109 mężczyzn, diagnozowanych w kierunku genetycznych przyczyn niepłodności w poradni genetyki klinicznej Centralnego Szpitala Klinicznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w okresie 31 lat (lata 1991-2001). Kwalifikowano wyłącznie pacjentów z niepłodnością pierwotną oraz wykulczano przypadki, w których kariotyp partnerki był nieprawidłowy. W grupie nr 1, obejmującej 1109 mężczyzn z niepłodnością pierwotną, przeprowadzono badanie kariotypu metodą prążków G z limfocytów krwi obwodowej. U mężczyzn z kariotypem mozaikowym, oceniono także kariotyp w fibroblastach skóry. U 565 pacjentów z grupy nr 1 (51% grupy wyjściowej), wykonano dodatkowo badanie w kierunku mikrodelecji w regionie AZF. Ponadto u 504 pacjentów (45% grupy nr 1) przeprowadzone zostało badanie molekularne genu *CFTR*, którego zakres różnił się istotnie

pod względem liczby analizowanych wariantów patogennych, w zależności od okresu, w którym wykonano diagnostykę. Zakres testów genetycznych dla genu *CFTR* obejmował 3, 35 lub 36 wariantów patogennych (w tym wariant Tn w intronie 8, w przypadku rozeszonych testów *CFTR*). Ponieważ grupa nr 1 pacjentów z niepłodnością rekrutowana była przez okres 31 lat, Autorka musiała przeprowadzić długą i żmudną analizę retrospektywną badanej grupy, co zasługuje na duże uznanie. Zakładam, że pewną część z zakwalifikowanych pacjentów Doktorantka konsultowała i diagnozowała osobiście, co byłoby warte odnotowania i podkreślenia w pracy. Jednak oczywistym jest, że przy tak dużej grupie badanych i długim okresie rekrutacji, nie było możliwe by wszyscy pacjenci pochodzili tylko z kolekcji Autorki. W mojej ocenie zakwalifikowana do analiz statystycznych grupa pacjentów z pierwotną niepłodnością męską jest bardzo duża i niezwykle cenna z poznawczego i dydaktyczno-klinicznego punktu widzenia. Objęcie przez Doktorantkę retrospektywnymi analizami tak dużej grupy pacjentów jest warte odnotowania i stanowić musiało niemałe wyzwanie organizacyjne i logistyczne. Opracowanie wyników wymagało ze strony Autorki wykazania się dużymi umiejętnościami w zakresie dobrej współpracy i komunikacji zarówno z lekarzami genetykami poradni genetycznej w Łodzi, jak i diagnostami laboratoryjnymi wykonującymi analizy cytogenetyczne i molekularne. Do części pracy opisującej grupę nr 1 i przeprowadzone u pacjentów badania genetyczne miałbym tylko kilka drobnych uwag. Jedynym badaniem, które wykonane zostało u wszystkich 1109 mężczyzn z niepłodnością było badanie kariotypu (prążki G) z limfocytów krwi obwodowej. Badania molekularne wykonane zostały u około połowy z tej grupy, co utrudnia przeprowadzenie kompletnych analiz statystycznych dla całej kohorty. Podobnie, zmienna liczba wariantów patogennych (3, 35 lub 36) analizowanych w genie *CFTR* u 503 pacjentów, czynni wyniki badań statystycznych niekompletnymi, a przez to mniej wartościowymi. W innej części Materiałów i Metod Doktorantka opisuje grupę badaną nr 2, obejmującą 103 pacjentów z oligozoospermią i azoospermią, u których wykluczono wszystkie przyczyny niepłodności, możliwe do zidentyfikowania w rutynowych testach diagnostycznych. W tej grupie, wykonano analizę częstości wariantów założycielskich genu *MTHFR* (c.665C>T oraz c.1298A>C) w odniesieniu do grupy kontrolnej 102 zdrowych mężczyzn, u których (jak można domniemywać), wyniki badań nasienia były prawidłowe. Sekcję tę Autorka kończy opisem metodologii analiz statystycznych. Słusznie do analizy zmiennych ilościowych i jakościowych, Autorka użyła różnych, odpowiednio dobranych testów. Za punkt odcięcia w testach przyjęto poziom istotności alfa = 0,05. Do rozważenia byłoby zastosowanie poprawki Bonferoniego, obniżającego współczynnik istotności alfa do 0,025 w odniesieniu jednoczesowego porównywania dwóch wariantów typu SNV w genie *MTHFR*. O ile to możliwe, prosilibym o odniesienie się do tej uwagi przez Doktorantkę w trakcie obrony. Poza jedynie drobnymi, przytoczonymi powyżej uwagami, muszę przyznać, że sekcja Materiałów i Metod została przez Autorkę przygotowana szczegółowo i starannie. Doktorantka bardzo dokładnie opisała metodykę badań cytogenetycznych i molekularnych, wraz z warunkami hodowli komórkowych, warunkami reakcji PCR i sekwencjami starterów.

W sekcji Wyniki Doktorantka przedstawiła rezultaty przeprowadzonych u pacjentów badań. Wyniki zaprezentowano w formie opisowej oraz 11-tu tabel (tabele 3-13) i 7-u rycin, w tym wykresów (ryciny 1-7). Wyniki zaprezentowany w prosty i przystępny sposób. W grupie mężczyzn z pierwotną niepłodnością męską wydzielono trzy grupy pacjentów: z prawidłowymi wynikami badania koncentracji plemników w nasieniu (normozoospermią), oligozoosperią i azoospermią. W

grupie 1109 chorych, u 88 (7,49%) zidentyfikowano aberracje chromosomowe. Odsetek aberracji chromosomowych był tym wyższy, im niższe było stężenie plemników w nasieniu. I tak w przypadku azoospermii, odsetek pacjentów, którzy mieli aberrację chromosomową wynosił 26,61%, w przypadku oligozoospermii – 2,6%, a w przypadku normozoospermii – 1,6%. Zgodnie z przewidywaniami, zdecydowanie najczęstszą aberracją chromosomową był zespół Klinefeltera z kariotypem 47,XXY lub w mozaice i występował on niemal wyłącznie u pacjentów z azoospermią. Innymi częstymi aberracjami skojarzonymi z niełodnością były translokacje wzajemne chromosomów oraz translokacje robertsonowskie, co również nie jest zaskakujące. Interesującym z naukowego punktu widzenia jest fakt identyfikacji 5 chromosomów markerowych, jako prawdopodobnej przyczyny niełodności u mężczyzn z azoospermią lub oligozoospermią. W pracy nie znalazłem pogłębionej diagnostyki, która identyfikowałaby pochodzenie chromosomu markerowego. Tego rodzaju diagnostyka, np. z wykorzystaniem metody mikromacierzy CGH, wniosłaby cenne informacje z poznawczego punktu widzenia.

Badanie regionu AZF chromosomu Y wykonano u 565 pacjentów z grupy nr 1. U 3,4% badanych stwierdzono mikrodelecję w AZF. Zmiana występowała najczęściej u mężczyzn z azoospermią (6,89% pacjentów z brakiem plemników w nasieniu) i 1,89% pacjentów z oligozoospermią. Z kolei badanie genu *CFTR* wykonano u 503 chorych, spośród których 8,35% miało przynajmniej jeden (lub dwa) warianty patogenne w genie. U pacjentów z azoospermią częstość mutacji w *CFTR* wynosiła 13,33%, w przypadku oligozoospermii było to 6,4%, a w normozoospermi – 5,4%. Należy jednak zaznaczyć, że częstości te nie są ostateczne, ponieważ u części pacjentów wykonano badanie 3 wariantów patogennych, a u innych 35 lub 36 zmian. U żadnego z pacjentów nie badano całej sekwencji kodującej *CFTR*, a wiadomo, że opisano już ponad 2000 różnych wariantów chorobotwórczych tego genu. Wspomniane ograniczenie zakresu analizy genu *CFTR* osłabia naukową wartość wyników. Choć w rutynowej diagnostyce rzadko wykonuje się kompleksową diagnostykę genu *CFTR* ze względu na jej wysoki koszt, wydaje się, że w opracowaniu naukowym, dobrze byłoby dysponować pełnymi danymi, obejmującymi wszystkie patogenne lub prawdopodobnie patogenne zmiany sekwencji genu.

Wyniki uzyskane w pracy uważam za cenne naukowo, zwłaszcza jeśli badania poszerzone zostaną o dodatkowe analizy, np. metodą mikromacierzy CGH (array CGH, aCGH - w przypadku chromosomów markerowych) i paneli NGS lub WES (w odniesieniu do azoo- i oligozoospermii). Rezultaty te wówczas przyniosą dużą wartość poznawczą, a dobrze scharakteryzowana liczna grupa pacjentów, jest zebrana i gotowa do badań. Już dziś wyniki uzyskane w pracy mają dużą wartość kliniczną i praktyczną dla genetyków klinicznych, ginekologów-położników i andrologów. Wyniki badań będą mogły być opublikowane w recenzowanym czasopiśmie z dziedziny genetyki rozrodu lub andrologii, ze względu na dużą liczebność grupy. Ponadto dzięki zidentyfikowaniu nieprawidłowości genetycznych, zdiagnozowanym pacjentom można było udzielić porady genetycznej i zaproponować lepszą opiekę prekonceptyjną i położniczą, w tym badania prenatalne i diagnostykę preimplantacyjną (PGD). Co ważne, u wszystkich zainteresowanych członków rodzin można było zaproponować badania kariotypu lub inne badania molekularne, aby zawczasu zidentyfikować kolejne pary wymagające poradnictwa genetycznego i wysoko specjalistycznych procedur leczenia niełodności. Dlatego wysoko należy ocenić wartość praktyczną zrealizowanych badań. Moje uwagi krytyczne do części Wyniki opisałem powyżej i odnoszą się one głównie do

braku poszerzenia metodologii o nowocześniejsze, bardziej kompleksowe i niosące większą wartość poznawczą techniki badań DNA, tj. aCGH i NGS. Ponadto w badaniach genu *MTHFR* (grupa nr 2) nie odnotowano istotnych różnic pomiędzy częstościami wariantów c.665C>T i c.1298A>C u pacjentów z niepłodnością w odniesieniu do grupy kontrolnej. Biorąc pod uwagę liczebności obu grup (103 vs 102 osoby), dalsza stratyfikacja na podgrupy pacjentów z azoo-, oligozoospermia i normozoospermia wydają się niecelowa, gdyż w niektórych pogrupach znajduje się tylko kilku pacjentów (np. 4, 7 lub 8 chorych).

W części Omówienie wyników i dyskusja Autorka przystąpiła do interpretacji uzyskanych rezultatów w odniesieniu do danych z piśmiennictwa. Częstości identyfikowanych aberracji chromosomowych oraz mikrodelekcji w regionie AZF u niepłodnych mężczyzn były zbliżone z danymi z piśmiennictwa. Porównanie częstości wariantów w genie *CFTR* z danymi z piśmiennictwa może być utrudnione ze względu na rozbieżność zakresów analiz w różnych opublikowanych wynikach badań. Niemniej jednak wszystkie trzy rutynowo stosowane metody diagnostyki genetycznej w niepłodności męskiej (tj. kariotyp, badanie regionu AZF i genu *CFTR*) okazały się efektywne w wykrywaniu genetycznych przyczyn niepłodności pierwotnej u mężczyzn, przynosząc diagnozę łącznie w ok. 10,5% przypadków. Kontrowersje budzić może wybór genu *MTHFR* do badań, zwłaszcza, że gen ten stał się „popularnym” obiektem badań u osób zdrowych, którzy lawinowo zgłaszają się na konsultacje z wynikami badań w obawie o swoje zdrowie. Liczba nieprawdziwych, niepopartych wynikami rzetelnych badań informacji nt. genu *MTHFR* dostępnych w Internecie budzi groźbę. Napotkać można liczne informacje o rzekomym związku nosicielstwa wariantów w tym genie z częstością występowania niepłodności, autyzmu, zespołu Downa oraz naczyń płaskich karku u noworodka... W dobie takiej atmosfery wokół genu *MTHFR* uważam, że nie byłoby dobrze, gdyby zwłaszcza niejednoznaczne wyniki badań stały się pożywką dla niekompetentnych, sięgających dezinformację nadaktywnych użytkowników forów pacjenckich.

Większość wniosek pracy została poprawnie sformułowana i odpowiada powziętym do realizacji celom. Autorka zauważa we wnioskach, że najistotniejszym i podstawowym badaniem genetycznym u niepłodnych mężczyzn jest kariotyp, który daje największą szansę identyfikacji przyczyny problemu medycznego. Autorka słusznie wnioskuje, że szansa znalezienia przyczyny niepłodności w badaniach genetycznych (kariotyp, region AZF, gen *CFTR*) jest tym większa, im gorsze pod względem koncentracji plemników są wyniki badania nasienia pacjenta. Doktorantka nie znalazła pozytywnej korelacji pomiędzy częstością wariantów genu *MTHFR* a niepłodnością męską. Jediną drobną uwagą z mojej strony, odnoszącą się do wniosków, byłoby stwierdzenie, że niektóre z nich (tj. wnioski 4, 5 i 6) są zbyt szczegółowe i stanowią raczej podsumowanie wyników niż *bona fide* wnioski.

Uzyskane wyniki Doktorantka omówiła w odniesieniu do bogatego, trafnie dobranego piśmiennictwa, obejmującego łącznie 113 pozycji. Wiele prac zostało opublikowanych w ostatnich latach. Praca została przygotowana bardzo starannie pod względem redakcyjnym, edytorskim i graficznym. Z recenzenckiego obowiązku muszę jedynie zwrócić uwagę na drobne błędy interpunkcyjne, polegające głównie na niezastosowaniu przecinka w zdaniach złożonych, co może prowadzić do dwuznacznego rozumienia niektórych zdań (np. str. 30, cyt.: „U pacjentów z grupy badanej 1 badanie molekularne *CFTR* było wykonywane od lipca 2004 r.”).

Pomimo kilku drobnych uwag krytycznych, przedstawioną mi do recenzji rozprawę doktorską Pani lek. Edyty Budzyńskiej oceniam dobrze. Mam nadzieję, że Doktorantka wykorzysta niektóre z uwag przy okazji przygotowywania publikacji naukowej z wyników pracy. Życzę też Doktorantce, by zgromadzona w trakcie realizacji pracy grupa pacjentów stała się punktem wyjścia do dalszych badań. Cenna wydaje się grupa pacjentów z azoospermią i oligozoospermią, u których możnaby przeprowadzić kolejne, kompleksowe, bardziej zaawansowane badania genetyczne.

W podsumowaniu stwierdzam, że zgodnie z art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach w zakresie sztuki, przedstawiona rozprawa doktorska lek. Edyty Budzyńskiej spełnia wymogi stawiane tego typu rozprawom i zwracam się do Rady Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie Pani lek. Edyty Budzyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Poznań, 26.09.2023

Prof. dr hab. n. med. Aleksander Jamsheer

Katedra i Zakład Genetyki Medycznej

Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

ul. Rokietnicka 8, 60-806 Poznań

tel. 61 854 76 18

email: jamsheer@wp.pl , a.jamsheer@genesis.pl , jamsheer@ump.edu.pl

Prof. dr hab. n. med. Aleksander Jamsheer
specjalista genetyki klinicznej, lekarz 1988816
specjalista laboratoryjnej genetyki medycznej
diagnosta laboratoryjny 11744
mgr biotechnologii
tel. +48 501 760 675