



60-535 Poznań
ul. Polna 33
Polska

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
Katedra Perinatologii i Ginekologii
Klinika Perinatologii i Chorób Kobięcych
Chair of Perinatology and Gynecology,
Karol Marcinkowski University of Medical Sciences
Department of Perinatology and Women's Diseases

Tel.: +48 (61) 8419-223, 8419-613
Fax.: +48 (61) 8474-651
e-mail: kdrews@gpsk.am.poznan.pl

Prof. dr hab. n. med. Krzysztof Drews

Poznań, 11.02.2019r.

Kierownik Kliniki

Krzysztof Drews, MD, PhD

Profesor

Head of Department

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

PT. ABERRACJE CHROMOSOMOWE I REARANŻACJE GENOMOWE U ZARODKA I

PŁODU JAKO PRZYCZYNA UTRATY CIĄŻY -

BADANIA METODĄ QF-PCR I MIKROMACIERZY CGH

LEK. KAROLINY MATUSZEWSKIEJ

Utrata ciąży jest niewątpliwie niełatwym doświadczeniem dla obojga rodziców, w szczególności jeśli po sobie występują 2 lub więcej poronienia. W populacji ogólnej, według najnowszych badań częstość poronień nawracających to około 1-3%, natomiast poronień sporadycznych nawet 15-30%. Jako przyczyny poronień wymieniane są przede wszystkim nieprawidłowości chromosomalne, zaburzenia hormonalne, zmiany anatomiczne dróg rodnych kobiety oraz czynniki immunologiczne. Dużą rolę w patomechanizmie tego powikłania przypisuje się także występowaniu chorób ogólnoustrojowych oraz infekcji. W przypadku par, które doświadczyły 2 i więcej poronień Polskie Towarzystwo Ginekologów i Położników rekomenduje poszerzoną diagnostykę w kierunku wymienionych powikłań, co ma wpływ na właściwe prowadzenie następnej ciąży. Najczęstszą przyczyną poronień samoistnych są aberracje chromosomowe, stąd diagnostyka genetyczna jest pierwszym krokiem

postępowania u par z obciążonym wywiadem w tym kierunku. Nadrzędnym celem jest określenie dokładnego podłoża genetycznego wystąpienia poronienia w celu wyłonienie grupy ryzyka par narażonych na wystąpienie następnego poronienia lub powtórzenia nieprawidłowości chromosomowych. Należy również zaznaczyć, że nowoczesne metody biologii molekularnej stanowią nieodzowną strategię dla tego typu badań, pozwalającą na szybką i właściwą odpowiedź co do przyczyny utraty ciąży.

Przedstawiona mi do oceny dysertacja ma układ typowy dla tego rodzaju opracowań, w całości zawarta jest na 190 stronach, dodatkowo załączono kopię zgody Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu na przeprowadzenie badań.

We Wstępie Autorka opisuje matczyne, ojcowskie i zarodkowe przyczyny wystąpienia poronień sporadycznych i nawracających. Dużą część stanowi fragment dotyczący metod analizy genetycznej znajdujących zastosowanie w badaniach materiału po poronieniu. Autorka opisuje m.in. wartość metod ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy (QF-PCR - *quantitative fluorescence polymerase chain reaction*) oraz porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy (aCGH - *array comparative genomic hybridization*), które zostały bezpośrednio zastosowane w przebiegu badań w rozprawie doktorskiej.

Postawione cele badań były wielokierunkowe i obejmowały określenie udziału aberracji chromosomowych i submikroskopowych rearanżacji genomowych w etiologii poronień, ocenę częstości powtarzania się aberracji chromosomowych w kolejnych ciążach u par z poronieniami nawracającymi, ocenę częstości występowania aberracji chromosomowych i rearanżacji submikroskopowych u par, u których u jednego z partnerów zidentyfikowano



zrównoważoną aberracją chromosomową, poszukiwanie genów kandydatów dla jednogenowych przyczyn poronień samoistnych, zaproponowanie algorytmu postępowania diagnostycznego w zakresie badań genetycznych u par z poronieniami nawracającymi. Cele pracy zostały jasno i logicznie sformułowane.

W dysertacji przedstawiono wyniki pochodzące z bardzo dużego materiału - analizą objęto 1244 kosmówek po poronieniach uzyskanych od 1193 pacjentek. Kosmówki pochodziły z ciąż utraconych pomiędzy 5 a 22 tyg. ciąży. Metodą aCGH analizowano 417 kosmówek, natomiast metodą QF-PCR - 827 kosmówek. Analizie poddano następujące dane: kolejność ciąży, z której pochodził badany materiał, kolejność poronienia, tydzień zakończenia ciąży, wyniki badań kariotypów obojga partnerów, wykonane wcześniej badania w kierunku trombofilii u pacjentki, wiek pacjentki oraz wiek partnera, sposób uzyskania ciąży, wywiad rodzinny partnerów oraz badania genetyczne kosmówek z poprzednich ciąż pacjentki. Dobór metod statystycznych nie budzi zastrzeżeń.

Najistotniejszymi wynikami uzyskanymi w pracy było wskazanie liczbowych aberracji chromosomowych u zarodków jako najczęstszej przyczyny poronień samoistnych oraz spadku częstości zmian liczbowych chromosomów wraz ze wzrostem liczby poronień. Większy odsetek wyników nieprawidłowych stwierdzono w kosmówkach badanych metodą aCGH (56,6%) w porównaniu do kosmówek badanych metodą QF-PCR (52,5%) (wynik nieistotny statystycznie). W obydwu grupach badanych metodą aCGH oraz QF-PCR najczęstszymi aberracjami chromosomowymi były trisomie chromosomów autosomalnych, z czego w obydwu grupach najczęściej identyfikowaną była trisomia chromosomu 16, natomiast drugą co do częstości występowania była trisomia chromosomu 21.



Interesującym pozostaje fakt, że najwyższą średnią wieku stwierdzono wśród pacjentek i ich partnerów z trisomią 21 chromosomu, natomiast najmłodszy wiekiem byli partnerzy gdzie w badaniu kosmówki stwierdzano trisomię 18 chromosomu. Pacjentki, u których w kosmówce stwierdzano trisomię 16 chromosomu były młodsze w porównaniu do wieku pacjentek z trisomią 21,22, 15. Doktorantka zwróciła również uwagę na fakt, iż częstość występowania trisomii 14 chromosomu była podobna jak częstość chromosomu 18 (5,79%), co wskazuje, że trisomia ta powinna znaleźć się wśród zmian badanych w materiale po poronieniu powyższymi metodami. Analiza liczby poronień w wywiadzie pokazała, że wraz ze wzrastającą liczbą poronień w wywiadzie zmniejsza się odsetek kosmówek z aberracjami chromosomowymi, co przemawia za poza chromosomowymi lub poza genetycznymi przyczynami poronień nawracających.

W wyniku przeprowadzonych badań metodą aCGH Doktorantka wskazała na zmiany strukturalne w kosmówkach o charakterze CNVs (mniejsze równe 5Mb), które stanowiły trzecią co do częstości występowania zmian chromosomową. Interesującym faktem była identyfikacja zmian strukturalnych w 6 kosmówkach o charakterze rearanzacji w regionie chromosomowym 3p21, gdzie znajduje się gen DAG1 kodujący podjednostkę alfa i beta dystroglikanu. Obserwacje te stwarzają interesujący kierunek badań udziału rearanzacji w tym regionie w etiologii poronień.

Z kolei w grupie kosmówek z ciąży uzyskanych poprzez inseminację nasienia partnera Doktorantka wykazała największy odsetek aberracji chromosomowych (66,6% aCGH i 81,8% QF-PCR). W grupie kosmówek z ciąży uzyskanych poprzez IVF odsetek wyników prawidłowych i nieprawidłowych był podobny przy analizie obydwoma metodami.

U 647 par przeprowadzono także analizę danych dotyczących kariotypów. Dane w ankietach pozwoliły na potwierdzenie nosicielstwa aberracji u 26 pacjentów



(4% wszystkich wyników) (translokacje, kariotyp mozaikowy, nosicielstwo inwersji).

Ciekawym spostrzeżeniem Autorki jest również wskazanie ograniczeń metody aCGH w wykrywaniu poliploidii. W przeprowadzonych badaniach metodą QF-PCR częściej identyfikowano triploidię (15,2 vs. 9,3% w metodzie aCGH). Ponadto w przeprowadzonych badaniach wytypowano regiony i geny, których dalsze analizy mogą poszerzyć stan wiedzy na temat genetycznych przyczyn utraty ciąży.

Przeprowadzenie przez Doktorantkę całościowych i wnikliwych analiz pozwoliło na zaproponowanie algorytmu postępowania diagnostycznego w zakresie badań diagnostycznych u par z poronieniami w wywiadzie i wskazanie metody aCGH jako metody o zdecydowanie lepszej wartości diagnostycznej. W rozprawie wskazano również na aktualizację algorytmu wykazując, że badania genetyczne kosmówki powinny być pierwszym elementem diagnostyki u par z obciążonym wywiadem w kierunku utraty ciąży.

Przedstawione wnioski w liczbie 5 mają zarówno charakter naukowy, jak i praktyczny, odpowiadają na założone w pracy cele.

W podsumowaniu podkreślić należy, że praca stanowi doskonale zintegrowanie nauk klinicznych i osiągnięć metod nowoczesnej biologii molekularnej. W rozprawie podjęto niesłychanie istotny problem z punktu widzenia klinicznego, prezentowane badania poparto właściwymi przesłankami merytorycznymi, a analizę genetyczną przeprowadzono przy zastosowaniu bardzo nowoczesnych metod. W ocenie recenzenta Doktorantka posiada rozległą wiedzę w temacie podjętych badań, jak również opanowała metody najnowszej generacji w zakresie biologii molekularnej. W całości rozprawa pokazuje biegłość Doktorantki w zakresie analizy, interpretacji dyskusji i właściwego formułowania wniosków. Dodatkową zaletę stanowi przejrzysty układ rozprawy doktorskiej oraz staranność całości opracowania.



W świetle powyższego mam zaszczyt zwrócić się do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego I Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu z wnioskiem o dopuszczenie lek. Karoliny Matuszewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na wybór i doskonałą realizację podjętego zadania w oparciu o nowoczesne techniki badawcze z zakresu analiz genetycznych oraz doniosły wkład w wiedzę o wymiarze poznawczym i klinicznym – wnoszę o wyróżnienie dysertacji.

Krzysztof Jędras