

Prof. dr hab. n. med. Ewa Birkner

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu BIURO RADY DYSCIPLINY NAUKI MEDYCZNE	
wpl. dnia	13-07-2022
L. dz. RN-BM/	MS6/2022

Zabrze, 12. 07. 2022r.

VIDI:  
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu  
RADA DYSCIPLINY NAUKI MEDYCZNE  
Przewodniczący  
prof. dr hab. Agnieszka Halon

**Recenzja rozprawy doktorskiej pt.**  
**„Ocena O-glikozylacji glikoprotein plazmy nasienia i jej potencjalnego związku**  
**z męskim potencjałem rozrodczym” mgr Justyny Szczykutowicz**  
**wykonanej pod kierunkiem dr hab. Mirosławy Ferens-Sieczkowskiej, prof. UMW**

W ostatnich latach nastąpił ogromny wzrost przypadków męskiej niepłodności, szczególnie w krajach wysoko rozwiniętych. Ma to znaczny wpływ na jakość życia mężczyzny prowadząc, oprócz braku potomstwa, nawet do zaburzeń psychicznych. Niepłodność w Polsce dotyka 1,5 miliona par, a według statystyk u 30% - 40% par spowodowana jest czynnikiem męskim. Dlatego też oprócz podstawowych badań takich jak budowa, liczba czy ruchliwość plemników, poszukuje się nowych markerów diagnostycznych niepłodności męskiej. Szczególną uwagę zwraca się również na plazmę nasienia, której składniki odpowiedzialne są za dojrzewanie plemników, wydłużenie czasu przetrwania gamet w żeńskich drogach rozrodczych oraz regulację matczynej odpowiedzi immunologicznej względem męskich gamet i rozwijającego się zarodka. W procesie zapłodnienia dużą rolę przypisuje się glikozylacji glikoprotein plazmy nasienia. Glikoepitopy rozpoznawane przez specyficzne lektyny mogą uczestniczyć w procesach immunomodulacyjnych towarzyszących zapłonienu. Dlatego też podjęte przez Doktorantkę badania są jak najbardziej aktualne i uzasadnione.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska jest opracowaniem trzech spójnych tematycznie prac opublikowanych w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym o wysokim współczynniku oddziaływania (łącznie IF to 10,039 co stanowi 230 punktów MNiSW). We wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszym autorem. Zgodnie z oświadczeniami współautorów załączonymi do rozprawy jej udział w ich powstawaniu był znaczący i polegał na: przygotowaniu koncepcji pracy, opracowaniu metodyki badań, wykonaniu analiz i interpretacji danych oraz ostatecznym redagowaniu manuskryptu. Ponadto udział w drugiej pracy obejmował nawiązanie współpracy z Uniwersytetem Kopenhaskim i wykonaniu tam badań podczas stażu naukowego w Laboratorium Glikobiologii Chemicznej.

Przesłana do recenzji rozprawa doktorska liczy 50 stron, w tym stronę tytułową, spis treści, wykaz publikacji wchodzących w skład doktoratu, spis stosowanych w pracy skrótów, wstęp, cele pracy, opis materiału, metodyki oraz analizy statystycznej wyników, wyniki, dyskusję, wnioski, piśmiennictwo oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. Ponadto do pracy dołączono odbitki kserograficzne trzech prac naukowych składających się na rozprawę doktorską. Zawierają one analizę piśmiennictwa

i ocenę stanu wiedzy z zakresu tematyki pacy (1 praca pogładowa) oraz wyniki przeprowadzonych badań, które stanowią zasadniczą część rozprawy (2 prace oryginalne):

1. **Szczykutowicz J**, Kałuża A, Kaźmierowska-Niemczuk M, Ferens-Sieczkowska M. The Potential Role of Seminal Plasma in the Fertilization Outcomes. *Biomed Res Int.* 2019 Aug 20;2019:5397804.
2. **Kołodziejczyk J**, Blixt O, Olejnik B, Zimmer M, Ferens-Sieczkowska M. Application of lectin microarrays for the analysis of seminal plasma glycome. *Andrologia.* 2018 Aug;50(6):e13018.
3. **Szczykutowicz J**, Tkaczuk-Włach J, Ferens-Sieczkowska M. Glycoproteins Presenting Galactose and N-Acetylgalactosamine in Human Seminal Plasma as Potential Players Involved in Immune Modulation in the Fertilization Process. *Int J Mol Sci.* 2021 Jul 8;22(14):7331. <https://doi.org/10.3390/ijms2214733>

Dołączono również oświadczenia współautorów dokumentujących ich indywidualny udział w powstawaniu powyższych publikacji. Analiza treści oświadczeń potwierdza wiodącą rolę Doktorantki w przygotowaniu tych publikacji, co uzasadnia uznanie tego dorobku jako osobistego wkładu w rozwój medycyny. Całość rozprawy doktorskiej zredagowana jest poprawnie z zachowaniem poprawności formalno-językowej, stylistycznej i interpunkcyjnej. Ponadto zamieszczenie wykazu skrótów stosowanych w rozprawie znacznie ułatwia jej czytanie.

We wstępie do omówienia prac składających się na rozprawę doktorską Autorka omówiła narastający problem męskiej niepłodności. Zwróciła przy tym uwagę na udział reszt cukrowych zawartych w glikoproteinach, które są rozpoznawane przez układ odpornościowy matki i biorą udział w rozwoju tolerancji immunologicznej podczas zapłodnienia i ciąży. Jest to podstawą hipotezy fetoembrionalnej która zakłada również, że oddziaływania białko-cukier w żeńskim układzie rozrodczym w okresie postkoitalnym są podobne do mechanizmów wykorzystywanych przez patogeny i komórki nowotworowe do uchylania się od odpowiedzi układu odpornościowego gospodarza. Zarówno patogeny, jak i przerzutowe komórki nowotworowe prezentują powierzchniowe antygeny cukrowe, które prawie nie występują w glikoproteinach płynów ustrojowych zdrowych ludzi. Okazuje się, że podobne glikany obecne są na powierzchni plemników oraz w glikoproteinach plazmy nasienia zdrowych, płodnych mężczyzn. Badania związane z analizą wzorca glikozylacji nasienia dotyczą głównie glikoepitopów zawierających fukozę i kwas sialowy, które jako ligandy dla endogennych lektyn występujących na komórkach odpornościowych, uważane są za immunomodulujące. Glikoepitopy te mogą być prezentowane zarówno na N-glikanach, jak i O-glikanach.

W dalszej części wstępu Doktorantka pokrótce omówiła metody standardowe zastosowane w swojej pracy. Szczególną uwagę zwróciła na zoptymalizowanie i dostosowanie do glikoprofilowania glikoprotein plazmy nasienia, nowej, wysokowydajnej techniki mikromacierzy lektynowych, która wykorzystuje bezpośrednią interakcję wielu prób z panelem lektyn o różnej specyficzności równocześnie. Poprzez miniaturyzację całego układu metoda pozwala na analizy przy użyciu niewielkich ilości odczynników, jest szybka i nie wymaga izolacji glikanów ani fragmentacji białka.

Dzięki temu analizowane glikoproteiny zachowują swoją nienaruszoną, naturalną konformację, obfitość i natywne rozmieszczenie przestrzenne glikoepitopów na swojej powierzchni, co z kolei ma znaczenie dla ich dostępności dla naturalnych ligandów *in vivo*. Metoda może być zatem przydatna w ocenie interakcji zachodzących w ustroju i stosowana jest przede wszystkim w przypadku znacznie trudniejszych do analizy O-glikanów.

W celach pracy Doktorantka przedstawiła cele każdej z trzech prac składających się na rozprawę doktorską. Głównym celem rozprawy doktorskiej była analiza O-glikomu glikoprotein plazmy nasienia i ocena potencjalnych zmian profilu O-glikozylacyjnego u mężczyzn o obniżonym potencjale reprodukcyjnym.

Celem pracy nr 1 stanowiącej część teoretyczną rozprawy doktorskiej była analiza i przedstawienie danych na temat udziału składników plazmy nasienia w procesie zapłodnienia.

Celem pracy nr 2 było zaprojektowanie i dostosowanie do analiz mikromacierzy zawierającej panel lektyn o różnej specyficzności, w tym lektyny rozpoznające O-glikany i wstępna analiza, która stała się punktem wyjścia do podjęcia dalszych, bardziej wnikliwych badań nad O-glikozylacją białek plazmy nasienia.

Celem pracy nr 3 była analiza O-glikanów typu mucynowego, w tym ich niekompletnych form – antygenów T i Tn, rozpoznawanych kolejno przez lektynę MPL i VVL

Szczegółowe cele pracy doktorskiej zostały sformułowane następująco:

1. Wstępna ocena profilu glikozylacji glikoprotein w próbach plazmy nasienia mężczyzn o różnym potencjale rozrodczym, przy wykorzystaniu zoptymalizowanej do tego celu metody opartej na technologii mikromacierzy lektynowych.
2. Ocena występowania niekompletnych O-glikanów typu mucynowego – antygenów T/Tn w poszczególnych frakcjach prób plazmy nasienia, pochodzących od mężczyzn o różnym statusie płodności.
3. Izolacja i identyfikacja białek plazmy nasienia będących nośnikami glikoepitopów prezentujących terminalną galaktozę lub GalNAc, w tym antygenów T i Tn.
4. Wstępne wytypowanie glikoprotein wykazujących różnice w prezentacji antygenów T/Tn w grupie mężczyzn o obniżonym potencjale reprodukcyjnym względem grupy mężczyzn o potwierdzonym ojcostwie.
5. Ocena potencjału O-glikozylacyjnego wytypowanych białek oraz identyfikacja ich partnerów funkcjonalnych i sieci interakcji przy wykorzystaniu technik bioinformatycznych.

Materiały i metody, a także charakterystyka kliniczna pacjentów zostały opisane w sposób wyczerpujący. Materiałem klinicznym wykorzystanym do badań była plazma nasienia 139 pacjentów w wieku 22–56 lat, żyjący w parach bezdzietnych. Na podstawie standardowego badania nasienia, zgodnie z wytycznymi WHO, wyodrębniono 4 grupy pacjentów: normozoospermiczną, (grupa kontrolna), oligozoospermiczną (liczba plemników <15 mln/ml), astenozoospermiczną (obniżona ruchliwość plemników) i oligoastenozoospermiczną (liczba plemników <15mln/ml i obniżona

ruchliwość plemników). Grupę kontrolną stanowiło 23 ochotników z potwierdzonym ojcostwem. W celu dokonania wstępnego porównania profilu glikozylacyjnego glikoprotein w próbach plazmy nasienia pochodzących od mężczyzn płodnych i niepłodnych skonstruowano mikromacierz zawierającą 18 lektyn o różnej specyficzności, w tym 6 charakterystycznych dla O-glikozylacji.

Wyniki zostały przedstawione w sposób przejrzysty i usystematyzowany i ujęte są we wnioskach.

W dyskusji do publikacji Doktorantka omówiła wyniki pracy w kontekście aktualnego piśmiennictwa światowego, obejmującego w większości ostatnie 13 lat. Doktorantka wykazała się doskonałą znajomością tematu a sposób prowadzenia dyskusji jest przejrzysty i w pełni odzwierciedla najważniejsze obserwacje z przeprowadzonych badań. Potwierdza to rzetelność naukową oraz doskonałą orientację Autorki w zakresie aktualnie prowadzonych badań klinicznych dotyczących zagadnień będących podstawą rozprawy doktorskiej.

W oparciu o uzyskane w swojej pracy wyniki Doktorantka, w podsumowaniu dyskusji, wysnuwa pewne sugestie, które można by wykorzystać w przyszłości w tego typu badaniach. Glikoprofilowanie należałoby poszerzyć o badania przeprowadzone na konkretnych białkach. Natomiast zoptymalizowana w ramach pracy metoda analiz przy wykorzystaniu mikromacierzy może być przydatnym narzędziem wykorzystanym w tym celu, zwłaszcza w kontekście O-glikozylacji, której analiza, pomimo intensywnego w ostatnim czasie rozwoju technik glikobiologicznych, wciąż stanowi wyzwanie. Również analiza interakcji wytypowanych składników nasienia z MGL wymaga kontynuacji, gdyż lektyna ta choć budzi duże zainteresowanie w ostatnich latach, jednak nigdy nie badano jej interakcji w kontekście procesu zapłodnienia.

Różnice w reaktywności poszczególnych frakcji prób z lektynami między grupami diagnostycznymi pacjentów wykazane w pracy mogą wskazywać na udział analizowanych epitopów w procesach prowadzących do skutecznego zapłodnienia, a więc mogą stanowić potencjalne immunologiczne biomarkery męskiej niepłodności.

W omówieniu prac składających się na rozprawę doktorską Autorka sformułowała osiem wniosków, które w pełni odpowiadają na pytania postawione w celach pracy.

Reasumując stwierdzam, że cele pracy doktorskiej zostały przez Doktorantkę jasno sformułowane. W publikacjach składających się na rozprawę doktorską przeprowadzono w sposób właściwy analizę literatury światowej oraz aktualnego stanu wiedzy, co świadczy o doskonałej wiedzy i doświadczeniu naukowym. Wnioski z pracy oraz przeglądu źródeł naukowych sformułowano w sposób jasny i przekonujący. Autorka w sposób właściwy uzasadniła przyjęte cele, rozwiązała postawione zagadnienia i użyła do tego adekwatnie dobranej metody badawczej. Wykazała się także umiejętnością poprawnego i przekonującego przedstawienia uzyskanych przez siebie wyników. Ponadto rozprawa została napisana w oparciu o publikacje zamieszczone w czasopiśmie o wysokim współczynniku oddziaływania w których Doktorantka jest pierwszym autorem, dlatego też oceniam ją

bardzo wysoko. Przedstawiona praca w pełni odpowiada kryteriom stawianym przed kandydatami do stopnia doktora.

„Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz.595, z późn. zm.)”.

W związku z tym mam zaszczyt zwrócić się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu z wnioskiem o dopuszczenie mgr Justyny Szczykutowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na jakość uzyskanych wyników oraz opublikowanie ich w wysoko punktowanych czasopismach naukowych zwracam się do Wysokiej Rady z wnioskiem o wyróżnienie przedstawionej mi do recenzji rozprawy doktorskiej.

Z poważaniem

Ewa Birkner