



UNIwersytet Medyczny
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU

Wydział Farmaceutyczny

ROZPRAWA DOKTORSKA

Ewa Magdalena Janiszewska

**Zmiany glikozylacji klasteryny oraz ekspresji
wybranych parametrów równowagi
oksydacyjno-antyoksydacyjnej
jako potencjalne biomarkery obniżonej płodności męskiej**

The changes in clusterin glycosylation and expression
of selected parameters of oxidative-antioxidant balance
as potential biomarkers of reduced male fertility

Katedra Diagnostyki Laboratoryjnej

Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej

Promotor:

dr hab. n. med. Ewa Maria Kratz, prof. Uczelni

Wrocław 2023

Streszczenie

Wprowadzenie: Niepłodność męska to narastający problem społeczny na świecie a jej mechanizmy molekularne nie zostały w pełni poznane. Nadal brakuje nowego, czułego biomarkera obniżonego potencjału rozrodczego mężczyzn, który mógłby uzupełnić standardową analizę nasienia, co byłoby szczególnie cenne w przypadkach niepłodności idiopatycznej. Skład proteomu plazmy nasienia, zarówno ilościowy (stężenia poszczególnych białek i glikoprotein), jak i jakościowy (m. in. zmiany ekspresji glikanów glikoprotein) jest jednym z kluczowych czynników wpływających na dojrzewanie plemników oraz proces zapłodnienia wewnątrzustrojowego. Wśród wielu przyczyn niepłodności męskiej szczególną uwagę zwraca się również na zaburzenia równowagi oksydacyjno-oksydacyjnej, określane mianem stresu oksydacyjnego (OS). Jedną z głównych glikoprotein plazmy nasienia jest klasteryna (CLU), pełniąca istotne funkcje w męskim układzie rozrodczym oraz będąca czułym biomarkerem OS. Zmiany stężenia i/lub profilu i stopnia glikozylacji CLU mogą stać się przyczynkiem do wzbogacenia procesu diagnostycznego zaburzeń męskiej płodności.

Cel badań: Celem badań było sprawdzenie zależności między stężeniem CLU, ekspresją jej glikanów a wybranymi wskaźnikami OS: TAS (*ang. total antioxidant status*), FRAP (*ang. ferric reducing antioxidant power*), stężeniami sirtuiny 3 oraz 5 (SIRT3 oraz SIRT5), w plazmach nasienia oraz surowicach niepłodnych mężczyzn. Ponadto sprawdzono, czy istnieją zależności między stężeniami wybranych parametrów biochemicznych plazmy nasienia, związanych ze statusem oksydacyjno-redukcyjnym, a stężeniami zaawansowanych produktów utleniania białek - AOPP (*ang. advanced oxidation protein products*). Dodatkowym aspektem było zaproponowanie zestawów parametrów, zarówno plazmy nasienia jak i surowicznych, mogących stać się dodatkowymi biomarkerami, różnicującymi grupy niepłodnych pacjentów z zaburzeniami dotyczącymi liczby, ruchliwości oraz morfologii plemników. Celem przeprowadzonych badań było także porównanie dwóch płynów ustrojowych, plazmy nasienia i surowicy, pod kątem zawartości w nich wybranych do oznaczeń parametrów, z równoczesną analizą ich potencjalnego zastosowania w diagnostyce męskiej niepłodności.

Materiał i metody: Materiałem badanym były 132 plazmy nasienia oraz 91 surowic krwi, pochodzące od niepłodnych pacjentów, które na podstawie wyników standardowej oceny nasienia podzielono na grupy: teratozoospermiczną (T), astenoteratozoospermiczną (AT), oligoastenoteratozoospermiczną (OAT), oraz normozoospermiczną (N). Stężenia CLU oznaczono metodą ELISA. Ekspresję fukozy sprawdzono za pomocą zmodyfikowanego testu lektyno-ELISA z wykorzystaniem biotynylowanych lektyn specyficznych wobec fukozy (*Lotus tetragonolobus* agglutinin - LTA, *Ulex europaeus* agglutinin - UEA, *Lens culinaris* agglutinin - LCA). Ekspresję struktur oligosacharydowych typu Lewis sprawdzono oznaczając stężenia fukozylotransfeazy 3 i 4 metodą ELISA. Ekspresję kwasu sialowego sprawdzono z użyciem zmodyfikowanego testu lektyno-ELISA z użyciem specyficznych biotynylowanych lektyn (*Sambucus nigra* agglutinin - SNA, *Maackia amurensis* agglutinin - MAA). Stężenia SIRT3 oraz SIRT5 oznaczono metodą ELISA. Stężenia TAS, FRAP, AOPP, żelaza, kwasu moczowego, wapnia oraz magnezu oznaczono metodą kolorymetryczną. Analizę statystyczną wykonano z wykorzystaniem oprogramowania Statistica 13.3 PL, za istotne uznając wyniki, dla których wskaźnik istotności $p < 0,05$.

Wyniki: Stężenia CLU w plazmach nasienia pacjentów z grupy OAT były istotnie wyższe w porównaniu do pozostałych grup niepłodnych mężczyzn. Surowicze stężenia CLU były natomiast istotnie niższe w grupie OAT w porównaniu z pozostałymi grupami badanymi. Stężenia FUT3 w plazmach nasienia były istotnie wyższe w grupie T w porównaniu do grup N oraz AT, a także istotnie wyższe w grupie OAT w porównaniu z grupami AT oraz N. Stężenia FUT4 w plazmach nasienia były istotnie wyższe u niepłodnych mężczyzn norozoospermicznych w porównaniu z pacjentami z grupy T oraz istotnie wyższe w grupie AT w porównaniu z grupą T. Względne reaktywności glikanów CLU obecnej w surowicach z fukozospecyficzną lektyną UEA były istotnie wyższe w grupie N w porównaniu z pozostałymi grupami badanymi. Podobnie, względne reaktywności glikanów CLU obecnej w surowicach z lektyną specyficzną wobec fukozy rdzeniowej - LCA, były istotnie wyższe w grupie N w porównaniu z pozostałymi grupami pacjentów. Ponadto wartość tego parametru była istotnie wyższa w grupie T w porównaniu z grupami OAT oraz AT. Analiza krzywych ROC oraz analiza skupień umożliwiły zaproponowanie panelu parametrów, przydatnych w różnicowaniu pacjentów z zaburzeniami dotyczącymi plemników. W plazmach nasienia były to: stężenia CLU,

FUT3 i FUT4, natomiast w surowicach: stężenia CLU i FUT4 oraz względne reaktywności glikanów CLU z fukozospecyficznymi lektynami UEA oraz LCA. Względne reaktywności glikanów CLU plazmy nasienia ze sjałospecyficzną lektyną MAA były istotnie niższe w grupie OAT w porównaniu do pozostałych grup pacjentów, natomiast ekspresja kwasu sjałowego SNA-reaktywnego na glikanach surowiczej CLU była istotnie wyższa w grupie OAT w porównaniu do pozostałych grup badanych. Stężenia SIRT3 w plazmach nasienia były istotnie wyższe w grupie N w porównaniu do grup T oraz OAT, a także stężenia tej sirtuiny były istotnie wyższe w grupie AT w porównaniu z grupami T oraz OAT. Stężenia surowiczej SIRT3 były istotnie niższe w grupie N w porównaniu z grupami AT oraz OAT. Stężenia SIRT5 w plazmach nasienia były istotnie niższe w grupie OAT w porównaniu do pozostałych grup pacjentów. Stężenia FRAP w surowicach pacjentów z grupy N były istotnie wyższe niż w grupie AT. Na podstawie analizy krzywych ROC oraz analizy skupień zaproponowano panel parametrów pozwalających na różnicowanie grupy OAT od pozostałych grup badanych, którymi są: względne reaktywności glikanów CLU plazmy nasienia ze sjałospecyficzną lektyną MAA, wartość współczynnika sjałilacji MAA/SNA, stężenia SIRT3, SIRT5 oraz FRAP. Analiza krzywych ROC oraz analiza skupień umożliwiły zaproponowanie zestawu surowicznych parametrów, przydatnych w różnicowaniu niepłodnych normozoospermicznych mężczyzn od pacjentów z nieprawidłowościami dotyczącymi plemników. Były to: względne reaktywności glikanów surowiczej CLU ze sjałospecyficznymi lektynami SNA i MAA oraz stężenia SIRT3 i FRAP. Stężenia AOPP w plazmach nasienia pacjentów z grupy N były istotnie wyższe w porównaniu z grupami AT oraz OAT, a także stężenia tego parametru były istotnie wyższe w grupie T w porównaniu do grup AT oraz OAT. Stężenia białka całkowitego w plazmach nasienia były istotnie niższe w grupie T w porównaniu do grup AT oraz OAT, natomiast stężenia żelaza w plazmach nasienia były istotnie niższe w grupie OAT w porównaniu do grup T oraz N. Analiza krzywych ROC wykazała, że oznaczenie stężeń AOPP w plazmach nasienia może stanowić dodatkowy parametr różnicujący niepłodnych normozoospermicznych mężczyzn od pacjentów z zaburzeniami dotyczącymi ruchliwości oraz budowy plemników, a także może stanowić obiecujący parametr różnicujący mężczyzn z zaburzeniami związanymi z ruchliwością plemników od tych z innymi typami zaburzeń dotyczących plemników.

Wnioski: Wyniki przeprowadzonych badań w znaczący sposób przyczyniły się do pogłębienia wiedzy na temat glikozylacji klasteryny obecnej w plazmach nasienia oraz surowicach mężczyzn z nieprawidłowościami dotyczącymi plemników. Różnice obserwowane w ekspresji lub stężeniach analizowanych parametrów sugerują, że zaburzenia liczby, ruchliwości oraz morfologii plemników nie są jedyną przyczyną niepłodności męskiej. Zmiany stężeń klasteryny oraz fukozylotransferaz 3 i 4 w plazmach nasienia mogą mieć związek z obniżoną liczbą plemników w nasieniu. Różnice w stężeniach surowiczej CLU, ekspresji fukozy rdzeniowej oraz fukozy przyłączonej wiązaniem α 1,2 do galaktozy anten cukrowych glikanów CLU mogą stanowić dodatkowe markery różnicujące normozoospermicznych niepłodnych mężczyzn od pacjentów z nieprawidłową liczbą, ruchliwością oraz morfologią plemników. Względna reaktywność glikanów surowiczej klasteryny z SNA może stanowić dodatkowy biomarker niepłodności męskiej, różnicujący z dużą czułością oraz swoistością niepłodnych normozoospermicznych pacjentów od mężczyzn z nieprawidłowymi wynikami badania nasienia. Stężenia AOPP oznaczane w plazmach nasienia mogą stanowić obiecujący parametr różnicujący mężczyzn z zaburzeniami związanymi z ruchliwością plemników od tych z innymi nieprawidłowościami dotyczącymi plemników, natomiast zmiany stężenia białka całkowitego w tym materiale biologicznym mogą mieć związek z zaburzeniami budowy plemników. Ponadto obniżone stężenia żelaza w plazmach nasienia korelowały dodatnio ze zmniejszoną liczbą plemników. W przyszłości poszerzenie spektrum badań o grupę normozoospermiczną mężczyzn o udowodnionej płodności da szansę na wytypowanie biomarkerów charakterystycznych dla męskiej niepłodności idiopatycznej.

Summary

Introduction: Male infertility is a growing problem around the world and the mechanisms of its development are not completely known yet. The early and sensitive biomarker of decreased male reproductive potential that could support the standard semen analysis, which would particularly be valuable in cases of idiopathic infertility, is still missing. The composition of seminal plasma proteome, the quantitative (proteins and glycoproteins concentrations) as well as qualitative (*e.g.* the changes in expression of glycoproteins glycans) is one of the key factor affecting spermatozoa maturation as well as intrauterine fertilization process. Among many male infertility reasons, special attention is paid also to oxidant-antioxidant imbalance, caused by oxidative stress (OS). One of the main seminal plasma glycoproteins is clusterin (CLU), playing important functions in the male reproductive tract, also known as sensitive OS biomarker. Changes in the concentration and/or profile and degree of CLU glycosylation may reach the diagnostic process of male fertility disorders.

Aim of the study: The aim of the study was to check if there are relationships between CLU concentration, its glycans' expression, and selected OS parameters: TAS (*total antioxidant status*), FRAP (*ferric reducing antioxidant power*), sirtuin 3 and 5 concentrations (SIRT3 and SIRT5, respectively) in seminal plasmas and sera of infertile men. Moreover, the correlations between concentrations of selected seminal plasma biochemical parameters associated with redox status and advanced oxidation protein products (AOPP) were also checked. Another aspect of the study was to select a set of seminal plasma and serum parameters which may become an additional biomarkers differentiating groups of infertile men with disorders in sperm count, motility and morphology. The aim of the study was also to compare two body fluids, seminal plasma and serum, in terms of the content of parameters selected for determination, with the simultaneous analysis of their potential use in the diagnostics of male infertility.

Materials and methods: The study material consisted of 132 seminal plasmas and 91 blood sera from infertile patients which were divided into groups on the basis of the results of standard semen analysis: teratozoospermic (T), asthenoteratozoospermic (AT), oligoasthenoteratozoospermic (OAT) and normozoospermic (N). CLU concentrations were determined using ELISA method. Fucose expression was checked

in the modified lectin-ELISA test with biotinylated lectins specific to fucose (*Lotus tetragonolobus* agglutinin - LTA, *Ulex europaeus* agglutinin - UEA, *Lens culinaris* agglutinin - LCA). The expression of Lewis oligosaccharide structures was checked by determining of fucosyltransferases 3 and 4 concentrations (FUT3 and FUT4, respectively) by ELISA test. Sialic acid expression was checked in the modified lectin-ELISA test with biotinylated lectins specific to sialic acid (*Sambucus nigra* agglutinin - SNA, *Maackia amurensis* agglutinin - MAA). The concentrations of SIRT3 and SIRT5 were determined using ELISA method. The concentrations of TAS, FRAP, AOPP, iron, uric acid, calcium and magnesium were determined using colorimetric methods. Statistical analysis of the obtained results was carried out using the Statistica 13.3 PL software, as significant considering the results for which the p values were lower than 0.05.

Results: Seminal plasma CLU concentrations were significantly higher in the OAT group in comparison to the other examined groups of infertile men. Serum CLU concentrations were significantly lower in the OAT group in comparison to the other examined groups. Seminal plasma FUT3 concentrations were significantly higher in the T group in comparison to the N and AT as well as these concentrations were significantly higher in the OAT group in comparison to the AT and N group. Seminal plasma FUT4 concentrations were significantly higher in the infertile N group in comparison to the T group and significantly higher in the AT group in comparison to the T group. Relative reactivities of serum CLU glycans with fucose-specific lectin UEA were significantly higher in the N group in comparison to the other examined groups. Relative reactivities of serum CLU glycans with core fucose-specific lectin LCA were also significantly higher in the N group in comparison to the other examined groups. Moreover, this parameter was significantly higher in the T group in comparison to the OAT and AT group. ROC curve analysis as well as cluster analysis enabled the selection the panel of parameters, useful in the differentiation the groups of patients with sperm cells disorders. For seminal plasma there were: concentrations of CLU, FUT3 and FUT4, whereas for serum there were: concentrations of CLU and FUT4, relative reactivities of CLU glycans with UEA and LCA. The relative reactivities of seminal plasma CLU glycans with sialic acid specific lectin MAA were significantly lower in the OAT group in comparison to the other examined groups, whereas the relative reactivities of serum

CLU glycans with sialic acid specific lectin SNA were significantly higher in the OAT group in comparison to the other examined groups. Seminal plasma SIRT3 concentrations were significantly higher in the N group in comparison to the T and OAT groups as well as the concentrations of SIRT3 in seminal plasmas were significantly higher in the AT group in comparison to the T and OAT groups. Serum SIRT3 concentrations were significantly lower in the N group in comparison to the AT and OAT groups. Seminal plasma SIRT5 concentrations were significantly lower in the OAT group in comparison to the other examined groups. Serum FRAP concentrations in the N group were significantly higher in comparison to the AT group. Based on the ROC curve analysis as well as cluster analysis, the panel of following seminal plasma parameters enabling the differentiation of OAT group from other analyzed groups was proposed: relative reactivities of CLU glycans with sialic acid specific lectin MAA, sialylation ratio, SIRT3, SIRT5 and FRAP concentrations. ROC curve analysis and cluster analysis enabled the selection of panel of serum parameters useful in the differentiation of infertile normozoospermic men from patients with abnormalities in the results of standard semen analysis. There were: relative reactivities of serum CLU glycans with sialic acid specific lectins SNA and MAA, SIRT3 and FRAP concentrations. Seminal plasma AOPP concentrations in the N group were significantly higher in comparison to the AT and OAT groups as well as the AOPP concentrations were significantly higher in the T group in comparison to the AT and OAT groups. Seminal plasma total protein concentrations were significantly lower in the T group in comparison the AT and OAT groups, while iron concentrations were significantly lower in the OAT group in comparison to the T and N groups. The ROC curve analysis showed that the determination of AOPP concentrations in seminal plasmas may constitute an additional parameter differentiating infertile normozoospermic men from patients with sperm motility and morphology disorders, and may also be a promising parameter differentiating men with sperm motility disorders from those with other types of disorders regarding sperm.

Conclusions: The results of conducted studies considerably contributed to the extending the knowledge concerning the glycosylation of clusterin present in seminal plasmas and sera of infertile men with sperm abnormalities. The differences observed in the expression or concentrations of analyzed parameters suggest that sperm count, motility and morphology disorders are not the only cause of male infertility.

The differences in the seminal plasma CLU, FUT3 and FUT4 concentrations may be associated with the lowered sperm count. The differences in the serum CLU concentrations, the expression of core fucose and this linked via α 1,2-glycosidic bound to antennary galactose of CLU glycans may constitute additional markers differentiating the normozoospermic infertile men from patients with abnormal sperm count, motility and morphology. Relative reactivities of serum CLU glycans with SNA may be used as an additional male infertility biomarker, differentiating infertile normozoospermic patients from men with sperm abnormalities with a high sensitivity and specificity. AOPP concentrations determined in seminal plasmas may be a promising parameter differentiating men with sperm motility disorders from those with other sperm abnormalities, while changes in total protein concentrations in this biological fluid may be related to sperm morphology disorders. In addition, decreased seminal plasma iron concentrations correlated positively with reduced sperm count. Expanding the spectrum of research with a normozoospermic group of men with proven fertility in the future will give a chance to select biomarkers related to idiopathic male infertility.