

RPA/10060/2023

RN-BF4000.4.2019

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
BIURO

RADY DYSCYPLINY NAUKI FARMACEUTYCZNE

Podpis Faralessko

19.06.2023



UNIWERSYTET MEDYCZNY w BIAŁYMSTOKU

Zakład Laboratoryjnej Diagnostyki Klinicznej

Prof. dr hab. n. med. Violetta-Joanna Dymicka-Piekarska

violetta.dymicka-piekarska@umb.edu.pl

Białystok, 2023-06-07

**Ocena rozprawy doktorskiej magister Ewy Magdaleny Janiszewskiej
pt.: „Zmiany glikozylacji klasteryny oraz ekspresji wybranych parametrów
równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnych jako potencjale biomarkery
obniżonej płodności męskiej”**

**wykonanej w Katedrze Diagnostyki Laboratoryjnej i Zakładzie Diagnostyki
Klinicznej Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu,
promotor: dr hab. Ewa Maria Kratz, profesor Uczelni.**

Przedłożona do recenzji praca doktorska jest zbiorem czterech tematycznie spójnych publikacji, w tym jednej przeglądowej i trzech oryginalnych, opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych m.in. *International Journal of Molecular Sciences* i *Cells*, o wysokim IF wynoszącym 21.480 i 520 punktach MNiSW. Czasopisma te stosują wnikliwy system oceny *peer review*, w którym uczestniczą międzynarodowi niezależni eksperci, w związku z tym recenzent niniejszej rozprawy doktorskiej jest *de facto* kolejnym recenzentem prac uprzednio pozytywnie ocenionych. Należy podkreślić, że prace powstały w krótkim okresie, w latach 2020-2022. Ponadto we wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszym autorem o istotnym udziale, co potwierdzają oświadczenia współautorów. Warto wspomnieć, że publikacje te są już cytowane, co jest dużym osiągnięciem i potwierdza dużą wagę kliniczną zarówno poruszanych tematów jak i samych publikacji.

Temat podjęty przez Doktorantkę dotyczący problemu bezpłodności uważam za bardzo aktualny i ważny z punktu widzenia klinicznego i społecznego. Problem bezpłodności dotyczy coraz większego odsetka par i wg najnowszych danych WHO, staje się istotnym problemem współczesnego świata. Standardowe badania oceniające płodność męską, badanie seminologiczne nie wykazują odchyień od normy nawet u 50% nieplodnych mężczyzn. Poszukiwanie nowych przyczyn i

mechanizmów prowadzących do bezpłodności a także potencjalnych biomarkerów wskazujących na bezpłodność lub obniżenie potencjału reprodukcyjnego mężczyźni jest jak najbardziej uzasadnionym tematem badawczym. Jak podaje doktorantka wspólnym mianownikiem wielu przyczyn niepłodności jest stres oksydacyjny, definiowany jako zaburzenie równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej w organizmie. Głównym materiałem biologicznym, w którym Doktorantka przeprowadzała swoje badania, oprócz surowicy, była plazma nasienia. Jak dotąd nie prowadzono analizy profilu i stopnia fukozytacji oraz sjalizacji klasteryny i oceny zdolności redukcji jonów żelaza (FRAP) w tym materiale, co podkreśla dodatkowo nowatorskie i oryginalne walory przeprowadzonych badań.

Rozprawa doktorska mgr Ewy Magdaleny Janiszewskiej liczy 62 strony. W mojej ocenie, układ pracy jest przejrzysty i zgodny z wymaganiami stawianymi rozprawom doktorskim. Napisana jest poprawnym językiem, wysoko oceniam rozprawę pod względem redakcyjnym. Dysertację rozpoczyna przejrzysty spis treści i wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. Właściwą treść rozprawy rozpoczyna zwięzły wstęp teoretyczny, który syntetycznie i kompleksowo przedstawia zagadnienia będące tematem rozprawy. Doktorantka przedstawia problem niepłodności męskiej, jej przyczyny i najnowsze - z 2021 r. rekomendacje WHO dotyczące badania nasienia u mężczyźni. Następnie przedstawia budowę i funkcje jednej z głównych glikoprotein plazmy nasienia – klasteryny, która była przedmiotem badania oraz opisuje badane procesy: glikozylacji, która jako jeden z głównych procesów potranslacyjnych determinuje właściwości i funkcje białek oraz stres oksydacyjny i jego wpływ na męską płodność. Informacje zawarte we wstępie w sposób wyczerpujący wprowadzają do podjętych badań, są też niezbędne dla zrozumienia hipotezy i zasadności prowadzonych badań.

Głównym celem rozprawy doktorskiej Pani Ewy Magdaleny Janiszewskiej była odpowiedź na pytanie czy plazma nasienia może być cennym materiałem biologicznym, w którym można badać nowe biomarkery płodności męskiej oraz czy takim biomarkerem może być występująca w plazmie nasienia klasteryna a także czy istnieje zależność pomiędzy surowicą a plazmą nasienia jako materiałami biologicznymi, w których oceniano ekspresję fukozy oraz kwasu sjalowego (struktur cukrowych klasteryny) jako markerów potencjalnych stresu oksydacyjnego. W następnej kolejności Doktorantka przedstawia cele szczegółowe poszczególnych publikacji oryginalnych. W mojej ocenie cele badawcze jakie postawiła sobie Doktorantka są sformułowane poprawnie, a sam pomysł dotyczący analizy plazmy nasienia jako materiału użytecznego diagnostycznie uważam za interesujący i istotny z punktu widzenia klinicznego i praktycznego. Z obowiązku Recenzenta sugerowałabym wyodrębnienie celów w punktach, co ułatwiłoby w dalszej części pracy wyciągnięcie konkretnych wniosków.

W kolejnym rozdziale „Materiały i metody zastosowane w badaniach” Doktorantka przedstawia materiał badany, grupy badane, metodykę badawczą oraz analizę statystyczną opisując je szczegółowo, oddzielnie dla każdego z artykułów oryginalnych. Materiałem badanym były: 132 plazmy nasienia i 91 surowic

pochodzące od niepłodnych mężczyzn w wieku 29-44 lata. Brakowało mi informacji o dokładnej liczbie pacjentów i czy od tych samych pochodziła plazma nasienia i surowice. Grupę badaną stanowili jedynie niepłodni mężczyźni, których podzielono na 4 podgrupy w oparciu o badanie ogólne nasienia zgodnie ze standardami WHO. W tym miejscu nasunęły mi się pytania: Czy nie należałoby poszerzyć grupy badanej o mężczyzn płodnych? Czy były jakieś kryteria wyłączenia z grupy badanej? Zastosowane metody badawcze i testy statystyczne są poprawne i nie budzą moich zastrzeżeń. Jako metody badawcze przede wszystkim zastosowałam różne modyfikacje testów immunoenzymatycznych (ELISA), które zostały one szczegółowo opisane w artykułach oryginalnych.

W rozdziale „Wyniki” Doktorantka przedstawiła najważniejsze wyniki badań opisane w poszczególnych publikacjach oryginalnych. Wyniki badań mgr Ewy Magdaleny Janiszewskiej można nazwać pionierskimi. W pierwszej publikacji oryginalnej po raz pierwszy w literaturze wykazała, że stężenie klasteryny w plazmach nasienia było istotnie statystycznie wyższe w grupie oligoastenoteratozoospermicznej (OAT) w porównaniu z pozostałymi grupami badanymi a w suowicy istotnie statystycznie niższe w grupie normozoospermicznej (N) w porównaniu z pozostałymi grupami. Poszczególne grupy pacjentów różniły się także m.in. stężeniem enzymu FUT3 i FUT4 w plazmach nasienia, względną reaktywnością glikanów klasteryny, zaś analiza korelacji wykazała ujemną zależność pomiędzy stężeniem klasteryny plazmy nasienia a całkowitą liczbą plemników i odsetkiem plemników poruszających się ruchem postępowym. Analiza ROC wykazała także, że stężenie klasteryny, FUT3 i FUT4 w plazmie nasienia mogą być pomocne w różnicowaniu niepłodnych grup pacjentów. Doktorantka zaproponowała także dwa panele biomarkerów, które mogą mieć potencjalne znaczenie w diagnostyce niepłodności. Na uznanie zasługują publikacje nr 3 i 4 opublikowane odpowiednio w *International Journal of Molecular Sciences* i w *Cells*, które cechują się dużym współczynnikiem oddziaływania i wysoką renomą. Kompleksowe badania, które Doktorantka przeprowadziła w pierwszej pracy dotyczyły m.in. oceny stężenia SIRT3 i SIRT5 zarówno w plazmach nasienia jak i surowicy w poszczególnych grupach niepłodnych mężczyzn. Ocena całkowitej zdolności antyoksydacyjnej wykazała, że jedynie stężenie FRAP w surowicy było istotnie wyższe u pacjentów normozoospermicznych w porównaniu do astenoteratozoospermicznych. Doktorantka wykazała także, że względna aktywność glikanów CLU z MAA, współczynnik sjalilacji, stężenie SIRT3 i SIRT5 mogą być dodatkowymi markerami różnicującymi pacjentów z nieprawidłowościami dotyczącymi plemników od niepłodnych mężczyzn z normozoospermią. Analiza krzywych ROC wykazała także, że SIRT3 jako jedyny parametr oznaczany w plazmie nasienia charakteryzuje się obiecującą wielkością pola pod krzywą AUC, tym samym wskazuje na jego potencjalną moc diagnostyczną. Zaproponowała także dwa panele biomarkerów – względna reaktywność glikanu CLU z MAA, współczynnik sjalilacji, stężenia SIRT3 i 5 (oznaczane w plazmie nasienia) oraz oznaczane w surowicy - względna reaktywność glikanu CLU z MAA, stężenie SIRT3 oraz FRAP, o możliwym znaczeniu

w diagnostyce niepłodności męskiej. W ostatniej z prac oryginalnych Doktorantka zajęła się oceną zależności między zaawansowanymi produktami utleniania białek (AOPP) a wybranymi parametrami biochemicznymi związanymi ze statusem oksydacyjno-redukcyjnym w plazmach nasienia niepłodnych mężczyzn. Stężenie AOPP w plazmach nasienia było wyższe w grupie pacjentów N oraz T w porównaniu z pozostałymi grupami. Natomiast stężenie białka całkowitego w grupie T było istotnie niższe w porównaniu do AT i AOT, a stężenie żelaza w plazmach nasienia wyższe niż w grupie OAT. AOPP może być parametrem różnicującym między grupą T a AT oraz OAT.

W rozdziale „Podsumowanie” Doktorantka dokonuje syntetycznej reasumpcji wyników badań własnych. W każdej z prac włączonych do cyklu publikacji doktorantka w sposób umiejętny i wnikliwy omówiła uzyskane wyniki, jednocześnie potrafiła poddać je krytycznej analizie w kontekście danych publikowanych przez innych badaczy. Świadczy to o dużej dojrzałości naukowej Doktorantki oraz wskazuje na profesjonalny nadzór nad badaniami na wszystkich etapach jej powstawania przez Panią Promotor Prof. Ewę Kratz. Swoje obserwacje podsumowuje dwiema bardzo ciekawymi rycinami, które prezentują zawłościami uzyskanych wyników badań. Przedstawia na nich zależności między sjałizacją a wybranymi parametrami stresu oksydacyjnego (Ryc. 1) oraz między stężeniami zaawansowanych produktów oksydacji białek (AOPP) oraz stężeniem białka całkowitego w plazmach nasienia a wybranymi parametrami standardowej analizy nasienia (Ryc. 2). Niezwykle cennym stwierdzeniem jest, że plazma nasienia, która dotąd nie znalazła zastosowania w diagnostyce rutynowej, może stanowić cenne źródło dodatkowych biomarkerów o potencjalnym znaczeniu diagnostycznym. Wyniki badań uzyskanych przez mgr Ewę Janiszewską przedstawiają nowe mechanizmy, które mogą odpowiadać za występowanie niepłodności męskiej idiopatycznej. Po raz pierwszy dokonała analizy profilu i stopnia fukozylacji oraz sjałilacji CLU oraz zdolności redukcji jonów żelaza (FRAP) zarówno w plazmach nasienia jak i surowicy. Zaproponowała nowe panele parametrów, które mogą stanowić dodatkowe badania w różnicowaniu grup niepłodnych mężczyzn. Tak więc oprócz niewątpliwych walorów poznawczych rozprawa doktorska charakteryzuje się także wartościami praktycznymi, które w chwili obecnej są jeszcze trudne do oszacowania, ale bardzo obiecujące. W tym miejscu jako recenzent ponownie zachęcam do pogłębienia badań i poszerzenia grupy badanej o mężczyzn płodnych, na co, ku mojej radości, także wskazuje Doktorantka. Metody jakich użyła do swoich badań (np. ELISA), są ogólnie dostępne i używane także w diagnostyce rutynowej mogłyby być więc cennym uzupełnieniem, albo wręcz pomóc w wyjaśnieniu przyczyny niepłodności u mężczyzn, które mogłyby w przyszłości stać się potencjalnymi celami terapeutycznymi.

Na koniec Doktorantka spośród wielu wniosków wynikających z poszczególnych badań formułuje trzy „Wnioski końcowe”, stanowiące wg Autorki *clue* Jej badań. Wnioski logicznie wynikają z uzyskanych wyników badań. Interesujące są także pytania jakie nasunęły się Doktorantce w toku prowadzonych badań w kontekście bariery krew – jądro i mogą być przedmiotem badań w przyszłości. Praca

wnosi istotne informacje m.in. na mało znany temat glikozylacji klasteryny, która występuje w plazmie nasienia i surowicy mężczyzn z nieprawidłowościami w budowie i ruchliwości plemników, wskazując iż to właśnie klasteryna oraz FUT3 i FUT4 mogą mieć związek z zaburzoną liczbą plemników w nasieniu.

Dysertację kończy Streszczenie w języku polskim i angielskim, spis literatury liczący 38 pozycji anglojęzycznych oraz wykaz skrótów, spis rysunków i załączniki. Literatura została poprawnie zacytowana we wstępie dysertacji. Załączniki 1-4 stanowią kopie artykułów: jednego przeglądowego i trzech oryginalnych. Doktorantka przedstawiła też źródła finansowania prac wchodzących w skład dysertacji. Publikacje były realizowane w ramach subwencji Katedry Diagnostyki Laboratoryjnej oraz dzięki finansom pochodzącym z Funduszu MNiSW oraz w ramach realizacji projektu dla „Młodych Naukowców” Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, co wskazuje na Jej umiejętności pozyskiwania funduszy na badania. Załącznik nr 5 przedstawia całkowity dorobek mgr Ewy Magdaleny Janiszewskiej przygotowany przez Bibliotekę Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Łączny IF publikacji, w których jest autorem lub współautorem wynosi 28.790 i 666,00 punktów MNiSW, Doktorantka jest także autorem 11 i współautorem 13 streszczeń krajowych. Załącznik 6 stanowią oświadczenia współautorów publikacji wchodzących w skład cyklu. Wszyscy współautorzy wyrazili zgodę na dołączenie poszczególnych publikacji do cyklu stanowiącego podstawę rozprawy doktorskiej mgr Ewy Janiszewskiej. Co prawda brak jest udziału procentowego Doktorantki w poszczególnych publikacjach, ale oceniając po wkładzie pozostałych współautorów jest on znaczący.

W podsumowaniu pragnę stwierdzić, że przedstawiony do oceny cykl publikacji spełnia wszystkie wymogi, jakie stawiane są tego rodzaju osiągnięciem naukowym. Wysoko oceniam wielowątkowe i kompleksowe podejście do podjętego problemu badawczego, które pozwoliło na wskazanie kilku istotnych danych oraz wskazanie kierunków dalszych badań. Nadesłaną do oceny pracę oceniam bardzo wysoko, świadczy o bardzo dobrym warsztacie naukowym Doktorantki i posiadaniu przez nią dużej wiedzy w podjętym temacie, potwierdzając tym samym umiejętność samodzielnego projektowania i prowadzenia badań naukowych.

W mojej opinii przedstawiona do oceny rozprawa pt.: *„Zmiany glikozylacji klasteryny oraz ekspresji wybranych parametrów równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnych jako potencjale biomarkery obniżonej płodności męskiej”* spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.) i w związku z powyższym zwracam się do Wysokiego Senatu Uniwersytetu im. Piastów Śląskich we Wrocławiu z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr Ewy Magdaleny Janiszewskiej o dopuszczenie do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej.

z poważaniem,

Wynicko-Peluso