



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ

IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości: IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA

Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.iitd.pan.wroc.pl

RPK/10623/2023

RN-BF4000.4.2019

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu

BIURO

DISYPLINA NAUKI FARMACEUTYCZNEJ

Podpis *Ferdynand*

26.06.2023

Wrocław, 19.06.2023 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Ewy Magdaleny Janiszewskiej

pt. „Zmiany glikozylacji klasteryny oraz ekspresji wybranych parametrów równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej jako potencjalne biomarkery obniżonej płodności męskiej”

wykonanej pod kierunkiem

Prof. dr hab. Ewy Marii Kratz

Niepłodność jest narastającym problemem społecznym, który dotyka coraz większej liczby współczesnych mężczyzn na świecie. Szacuje się, że aż 50% przypadków niepłodności u mężczyzn stanowi niepłodność idiopatyczna, tj. bez wyjaśnionej dotąd przyczyny. W świetle obecnych badań uważa się, że skład proteomiczny plazmy nasienia stanowi jeden z kluczowych czynników wpływających na dojrzewanie plemników, jak i proces zapłodnienia. Dotyczy to zarówno składu ilościowego, odzwierciedlonego przez m.in. zmiany stężeń poszczególnych białek i glikoprotein, jak i jakościowego, manifestującego się na przykład zmienioną ekspresją glikanów glikoprotein. Kolejnym istotnym czynnikiem odgrywającym rolę w procesie zapłodnienia jest stres oksydacyjny. Badania będące przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej dotyczą zmienionej ekspresji łańcuchów N-glikozydowych klasteryny, tj. głównej glikoproteiny plazmy nasienia ludzkiego, będącej czułym wskaźnikiem stresu oksydacyjnego. Badania te zostały przeprowadzone w Zakładzie Diagnostyki Laboratoryjnej na Wydziale Farmacji, Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Stanowią one kontynuację badań prowadzonych wcześniej w tym Zakładzie pod kierunkiem Pani Prof. Kątnik-Prastowskiej dotyczących m. in. stopnia i profilu glikozylacji fibronektyny, α 1 kwaśnej glikoproteiny oraz innych glikoprotein uczestniczących w procesach związanych z procesem zapłodnienia, takich jak immunoglobuliny A oraz immunoglobuliny G. Postawiony problem badawczy ma znaczenie nie tylko poznawcze, ale może mieć również swoje implikacje



Krajowy Naukowy Ośrodek Wiodący (KNOW) Wrocławskie Centrum Biotechnologii 2014-2018

kliniczne i w przyszłości przyczynić się do zaprojektowania nowych markerów diagnostycznych. Zatem podjęty temat pracy doktorskiej jest w pełni uzasadniony.

Tytuł przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej „Zmiany glikozylacji klasteryny oraz ekspresji wybranych parametrów równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej jako potencjalne biomarkery obniżonej płodności męskiej” jest trafny i odzwierciedla jej zawartość. Część pierwszą, o objętości 62 strony, stanowi autoreferat, który obejmuje: wykaz publikacji stanowiących cykl czterech tematycznie spójnych artykułów będący podstawą rozprawy doktorskiej, wprowadzenie, cel pracy, charakterystykę badanych grup pacjentów i opis stosowanej metodologii, opis najważniejszych wyników badań łącznie z ich analizą statystyczną i podsumowaniem, wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz cytowanych pozycji piśmiennictwa w liczbie 38, źródła finansowania, wykaz stosowanych skrótów, spis rysunków oraz wykaz załączników. Drugą część rozprawy Doktorantki, ubiegającej się o stopień doktora nauk farmaceutycznych, stanowią: artykuł przeglądowy z 2020 roku oraz trzy publikacje oryginalne opublikowane w latach 2021-2022; wszystkie w czasopismach z listy filadelfijskiej o zasięgu międzynarodowym. Dorobek naukowy Doktorantki uzupełniają publikacje niezwiązane z rozprawą doktorską oraz wykaz 42 abstraktów konferencyjnych. Na uwagę zasługuje fakt, że we wszystkich publikacjach stanowiących podstawę niniejszej rozprawy doktorskiej Pani mgr Ewa Magdalena Janiszewska jest pierwszym autorem. Zarówno z oświadczenia Pani Prof. dr hab. Ewy Marii Kratz, jak i oświadczeń pozostałych współautorów prac składających się na niniejszą rozprawę doktorską wynika, że Doktorantka uczestniczyła w doborze metod badawczych i ich optymalizacji, przeprowadziła część doświadczeń, analizowała oraz interpretowała uzyskane wyniki oraz uczestniczyła w przygotowaniu manuskryptów niniejszych prac. Chociaż nie zostało to nigdzie jasno określone, można przypuszczać, że udział Doktorantki w powstawaniu publikacji stanowiących podstawę niniejszej rozprawy doktorskiej był większy niż 60%. Publikacje stanowiące podstawę pracy doktorskiej są tematycznie powiązane z aktualnym i właściwie dobranym piśmiennictwem, zostały wzbogacone o schematy, tabele, ryciny i dendrogramy dobrze ilustrujące uzyskane wyniki badań. Poprawny język oraz bardzo staranne opracowanie rycin czyni je dodatkowo przyjemne w odbiorze. Pragnę podkreślić, że w mojej opinii w przypadku rozprawy doktorskiej prezentowanej w formie cyklu prac, które ukazały się w renomowanych czasopismach z listy filadelfijskiej, należy uwzględnić fakt ich przejścia przez rygorystyczny tryb oceny *peer-review*. Prace oryginalne cechuje bowiem wysoki współczynnik wpływu IF, odpowiednio *Scientific Reports* IF=4,997; *Cells* IF=7,666; *International Journal of Molecular Sciences* IF=6,208. Łączny współczynnik wpływu IF wynosi 28,790 a punkty MNiSW wynoszą 620.

Przedstawiona do recenzji część pierwsza rozprawy doktorskiej ma typowy układ z podziałem na poszczególne rozdziały. We wstępie Pani mgr Ewa Magdalena Janiszewska

w przemyślany sposób wprowadza w tematykę zagadnień będących przedmiotem jej badań, porusza m. in. zagadnienia związane z etiopatogenezą męskiej niepłodności, strukturalną i funkcjonalną charakterystyką klasteryny, glikozylacją będącą czynnikiem determinującym właściwości funkcjonalne białek oraz wpływem stresu oksydacyjnego na niepłodność u mężczyzn. Autorka w sposób precyzyjny zdefiniowała główny cel pracy, jakim była identyfikacja potencjalnych markerów diagnostycznych różnicujących niepłodnych mężczyzn ze zmienionymi parametrami nasienia dotyczącymi liczby, morfologii oraz ruchliwości plemników. Cele szczegółowe zostały również jasno określone i obejmowały one: i) analizę łańcuchów N-glikozydowych klasteryny pochodzącej zarówno z plazmy nasienia, jak i surowicy niepłodnych mężczyzn, szczególnie pod kątem ich fukozytacji i sialilacji, ii) sprawdzenie, czy istnieje zależność pomiędzy dwoma analizowanymi płynami biologicznymi w ekspresji N-glikanów oraz iii) określenie, czy istnieje zależność pomiędzy stężeniem klasteryny, ekspresją jej N-glikanów oraz wybranymi wskaźnikami stresu oksydacyjnego, jak również parametrami biochemicznymi związanymi z zaburzeniami równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej.

Włączona do jednotematycznego cyklu wchodzącego w skład niniejszej rozprawy publikacja pierwsza przedstawia budowę i funkcję klasteryny w kontekście zaburzeń płodności u mężczyzn. Dwa kolejne opracowania stanowią publikacje dotyczące badań profilu glikozylacji, tj. odpowiednio fukozytacji i sialilacji klasteryny obecnej w plazmach nasienia oraz surowicach pacjentów. Ostatnia włączona do cyklu publikacja prezentuje wyniki badań dotyczących zależności między zaawansowanymi produktami utleniania białek (AOPP, *ang. advanced oxidation protein product*) a wybranymi parametrami biochemicznymi, takimi jak: białko całkowite, żelazo, kwas moczowy, magnez i wapń. Badania przeprowadzono na 132 próbkach nasienia oraz na 91 próbkach surowic pobranych od pacjentów zgłaszających się do Centrum Ginekologii, Położnictwa i Neonatologii w Opolu (zgodnie z opinią Komisji Bioetycznej KB-549/2019 oraz KB-591/2021) oraz Kliniki Leczenia Niepłodności InviMed w Warszawie (zgodnie z opinią Komisji Bioetycznej KB-765/2018, KB-103/2019 oraz KB-117/2020). Kryteria włączenia i wyłączenia pacjentów do wyżej wymienionych grup zostały precyzyjnie określone. W oparciu o wyniki badania ogólnego nasienia, wykonanego zgodnie z obowiązującymi standardami WHO z 2010 roku, w zależności od liczby, morfologii i ruchliwości plemników, niepłodni pacjenci zostali sklasyfikowani w następujące grupy: normozoospermiczną, teratozoospermiczną, astenoteratozoospermiczną oraz oligoastenoteratozoospermiczną. Czynnikiem ograniczającym był brak grupy normozoospermicznej zdrowych mężczyzn, o udowodnionej płodności, o czym Autorka wspomina zarówno w swoim autoreferacie, jak i w dyskusji w prezentowanym cyklu prac.

Metody immunochemiczne, biochemiczne oraz kolorymetryczne, jak również zaawansowane narzędzia statystyczne, zastosowane przez Autorkę, są adekwatne do

realizacji założonych celów badawczych. Ilość oraz różnorodność wykonanych analiz statystycznych świadczą o bardzo dobrym opanowaniu warsztatu badawczego przez Doktorantkę, wskazując na jej dojrzałość naukową oraz dużą wiedzę w zakresie planowania i przeprowadzania doświadczeń.

Wyniki przeprowadzonych badań zawarte w cyklu 4 publikacji stanowiących podstawę pracy doktorskiej udzieliły odpowiedzi na postawione pytania badawcze, co stanowi niezbyty dowód na to, że Autorka w całej rozciągłości zrealizowała zadeklarowany nie tylko główny cel badań, ale i postawione cele szczegółowe. Zwieńczeniem rozprawy doktorskiej jest szczegółowe omówienie i podsumowanie uzyskanych wyników, przeprowadzone prawidłowo, co pozwala ocenić oryginalność oraz nowatorstwo przeprowadzonych badań. Dowodem na to są zawarte w podsumowaniu najważniejsze wyniki, które jednoznacznie wskazują, że:

- 1) Ekspresja klasteryny różniła się między badanymi grupami oraz płynami biologicznymi,
- 2) Profil i stopień fukozytacji klasteryny różnił się między badanymi grupami oraz płynami biologicznymi, co sugeruje odmienne mechanizmy prowadzące do glikozylacji glikoprotein w surowicy i w plazmie nasienia,
- 3) Profil i stopień sialilacji klasteryny różnił się między badanymi grupami oraz płynami biologicznymi i był prawdopodobnie związany z zaburzeniami równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej u nieplodnych mężczyzn,
- 4) Stężenie AOPP w plazmie nasienia nieplodnych mężczyzn normozoospermicznych było istotnie wyższe od tych obserwowanych w grupie astenoteratozoospermicznej oraz oligoastenoteratozoospermicznej. Dodatkowo stężenie AOPP w grupie teratozoospermicznej było również istotnie wyższe od tych obserwowanych w grupie astenoteratozoospermicznej oraz oligoastenoteratozoospermicznej,
- 5) Stężenia białka całkowitego w plazmach nasienia w grupie teratozoospermicznej było istotnie niższe w porównaniu do grupy astenoteratozoospermicznej oraz oligoastenoteratozoospermicznej,
- 6) Poziom żelaza w plazmach nasienia był istotnie niższy w grupie oligoastenoteratozoospermicznej w porównaniu do grupy normozoospermicznej oraz teratozoospermicznej.

Doktorantka poddaje dyskusji wyniki badań, którym towarzyszyła trafna interpretacja danych. Autorka spekuluje, że obniżona liczba plemników w nasieniu może mieć związek ze zmienioną ekspresją klasteryny oraz fukozylotransferaz 3 i 4 obecnych w tym płynie biologicznym, co odnotowano w grupie oligoastenoteratozoospermicznej w porównaniu do pozostałych grup badanych pacjentów. Ponadto zaobserwowane różnice w stężeniach surowiczej klasteryny, ekspresji fukozy rdzeniowej, jak również fukozy przyłączonej wiązaniem α 1,2 do Gal anten cukrowych N-glikanów klasteryny mogłyby stanowić dodatkowy panel markerów różnicujących normozoospermicznych nieplodnych mężczyzn od pacjentów

z obniżoną liczbą, zmienioną morfologią oraz ruchliwością plemników. Analiza za pomocą krzywej ROC oraz analiza skupień umożliwiły zaprojektowanie panelu biomarkerów przydatnych w różnicowaniu badanych grup niepełnych mężczyzn. W plazmach nasienia były to: stężenia klasteryny, fukozylotransferazy 3 i 4 natomiast w surowicach: stężenia klasteryny, fukozylotransferazy 4 oraz względne reaktywności N-glikanów klasteryny z fukozylospecyficznymi lektynami *Ulex europaeus* agglutinin (UEA) i *Lens culinaris* agglutinin (LCA).

Zaproponowano również panel biomarkerów plazmy nasienia, przydatny w różnicowaniu niepełnych mężczyzn z grupy oligoastenoteratozoospermicznej od pozostałych grup badanych, w skład którego wchodziły: względne reaktywności N-glikanów klasteryny plazmy nasienia ze sjałospecyficzną lektyną *Maackia amurensis* agglutinin (MAA), wartość współczynnika sjałilacji MAA/ *Sambucus nigra* agglutinin (SNA), stężenia sirtuiny 3 i 5 oraz ocena zdolności redukcji jonów żelaza (FRAP, ang. *ferric reducing antioxidant power*). Z kolei stopień ekspresji SNA- i MAA-reaktywnego kwasu sjałowego na N-glikanach klasteryny oraz stężenia sirtuiny 3 i FRAP w surowicy mogłyby stanowić dodatkowy panel parametrów, pomocny w różnicowaniu niepełnych pacjentów normozoospermicznych, jak i tych, których wyniki analizy seminologicznej wykazują nieprawidłowości. Co więcej, istnienie pozytywnych korelacji między stężeniami sirtuiny 3 i 5, zarówno w plazmie nasienia, jak i w surowicy sugerowało synergistyczne działanie tych enzymów w zaburzeniach równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej u niepełnych mężczyzn.

Ponadto badania te nasuwały przypuszczenie, że obniżone stężenie żelaza w plazmach nasienia może odzwierciedlać zmniejszoną żywotność plemników, podczas gdy zmniejszone stężenie białka całkowitego może wpływać na ich zmienioną morfologię. Dodatkowo obecność silnej pozytywnej korelacji pomiędzy poziomem wapnia i magnezu, wapnia i żelaza oraz magnezu i żelaza w plazmie nasienia niepełnych mężczyzn poddawało pod rozwagę fakt, że pierwiastki te odgrywają ważną rolę w procesie dojrzewania plemników, a także w reakcji kapacytacji i reakcji akrosomalnej. Ocena przydatności diagnostycznej za pomocą krzywych ROC wykazała, że stężenie AOPP w plazmie nasienia może stanowić parametr różnicujący niepełnych mężczyzn należących do grupy normozoospermicznej, jak również teratozoospermicznej, od tych z grupy astenoteratozoospermicznej oraz oligoastenoteratozoospermicznej. Oprócz tego stężenia białka całkowitego w plazmach nasienia umożliwiło różnicowanie grupy astenoteratozoospermicznej od grupy teratozoospermicznej, natomiast poziom żelaza był czynnikiem różnicującym grupę normozoospermiczną od grupy oligoastenoteratozoospermicznej. Zatem zastosowane dedykowane analizy statystyczne pozwoliły na zrealizowanie w całości założonych celów, a uzyskane w trakcie realizacji pracy doktorskiej wyniki rzucają nowe światło na aktualny stan wiedzy na temat przyczyn i mechanizmów prowadzących do niepełności u mężczyzn.

Rozprawa doktorska jest napisany poprawnym językiem, chociaż Doktorantka nie uniknęła drobnych błędów językowych oraz niefortunnych sformułowań, takich jak „koncentracja” plemników (str. 19) czy skrótów myślowych „nieprawidłowa” liczba plemników (str. 38, 41 i 47). Jednakże zamieszczone tutaj uwagi i wątpliwości nie mają wpływu na moją bardzo wysoką ocenę pracy.

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Ewy Magdaleny Janiszewskiej w formie publikowanego cyklu prac objętych wspólnym tytułem „*Zmiany glikozylacji klasteryny oraz ekspresji wybranych parametrów równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej jako potencjalne biomarkery obniżonej płodności męskiej*” spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 187 ust. 1 i 2 ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 roku (Dz. U. z 2018 r., poz. 1668 ze zm.). W związku z powyższym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie Pani mgr Ewy Magdaleny Janiszewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prezentowane badania mogą w przyszłości przyczynić się do lepszego poznania molekularnych mechanizmów leżących u podstaw obniżenia męskiego potencjału rozrodczego. Różnice obserwowane w ekspresji i/lub stężeniach wyżej wymienionych parametrów sugerują, że zaburzenia dotyczące liczby, morfologii oraz ruchliwości plemników nie są jedyną przyczyną niepłodności u mężczyzn. Z uwagi na wysoki poziom recenzowanej dysertacji i jej istotny wkład w rozwój wiedzy na temat wpływu zmienionego profilu glikozylacji i stresu oksydacyjnego na niepłodność u mężczyzn oraz możliwość praktycznego zastosowania uzyskanych wyników w diagnostyce klinicznej, wnioskuję jednocześnie o jej wyróżnienie.


Dr hab. n. med.
Maria Podbielska