



Pani mgr Katarzyny Sołkiewicz  
pod tytułem  
„Analiza profilu i stopnia glikozylacji surowiczej immunoglobuliny G  
u kobiet z zaawansowaną endometriozą”

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Katarzyny Sołkiewicz została wykonana pod kierunkiem dr hab. n. med. Ewy Marii Kratz, prof. uczelni, oraz prof. dr. hab. Huberta Krotkiewskiego w Katedrze i Zakładzie Diagnostyki Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, pełniących funkcję ko-promotorów.

Rozprawa została przygotowana w postaci cyklu trzech oryginalnych artykułów opublikowanych w latach 2021-2022 w czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym, uwzględnianych na liście *Journal Citation Reports* i indeksowanych w bazie Web of Science. Łączny współczynnik oddziaływania (IF) czasopism, w których opublikowano artykuły wynosi 15,835, a suma punktów wg wykazu czasopism naukowych Ministerstwa Edukacji i Nauki to 420. Artykuły te tworzą spójną tematycznie całość i do tej pory były cytowane 7 razy wg bazy Scopus (stan z 01.06.2023). Wszystkie artykuły są dostępne w wersji *Open access*. Publikacje są współautorskie (4-5 autorów). Wykonanie badań opisanych w tych publikacjach zostało sfinansowane z subwencji Ministra Zdrowia wg systemu SIMPLE Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, a projekt badań został pozytywnie zaopiniowany przez Komisję Bioetyczną działającą przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu.

W każdym z artykułów cyklu Pani mgr Katarzyna Sołkiewicz jest pierwszą autorką, a w jednym z nich (*Int. J. Mol. Sci.*) pełniła również funkcję autora korespondencyjnego. Zgodnie z dołączonym do rozprawy doktorskiej oświadczeniem, udział Doktorantki w każdej z tych prac polegał na współtworzeniu planu badań, wykonaniu części eksperymentalnej, analizie i interpretacji uzyskanych wyników, formułowaniu wniosków, zebraniu i analizie piśmiennictwa, współtworzeniu tekstu manuskryptu oraz korekcie formy manuskryptu. Podany w oświadczeniu Doktorantki zakres jej działalności jest zgodny z deklaracjami o wkładzie poszczególnych autorów, które zostały zamieszczone w artykułach opublikowanych w *Sci. Rep.* oraz *Int. J. Mol. Sci.* Z uwagi na fakt, że współautorzy artykułów w swoich oświadczeniach podali tylko zakresy działań, w które byli zaangażowani, ale nie określili swojego zaangażowania w wartościach procentowych, nie można oszacować jaki był wkład procentowy Doktorantki w powstanie niniejszych publikacji. Nie mniej jednak, na podstawie szerokiego zakresu wspomnianych powyżej zadań, w których uczestniczyła Doktorantka, można wnioskować, że Jej wkład był znaczący i ma ona pełne prawo do włączenia wymienionych artykułów do cyklu publikacji stanowiącego podstawę ubiegania się o nadanie stopnia naukowy doktora.

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Zakład Biochemii

Glikokoniugatów

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel.: 12 664 64 62

fax: 12 664 51 01

<http://www.uj.edu.pl/web/instytut-zoologii/jednostka/struktura/zaklad-biochemii-glikokoniugatow>



UNIWERSYTET  
JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

Rozprawa doktorska oprócz trzech oryginalnych artykułów tworzących cykl tematyczny, zawiera dziesięć dodatkowych sekcji o tytułach: *Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej, Omówienie, Wykaz skrótów, Piśmiennictwo, Streszczenia pracy w języku polskim i angielskim, Oświadczenia współautorów, Opinię Komisji Bioetycznej, Źródła finansowania i Całkowity dorobek naukowy*. Cała rozprawa doktorska zajmuje 114 stron. Moim zdaniem dla pierwszej z wymienionych sekcji, bardziej adekwatny byłby tytuł: *Spis publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej*. W sekcji *Omówienie* oprócz zwięzłego wprowadzenia do tematów badań, Doktorantka zdefiniowała cele i założenia badawcze, opisała wykorzystywaną metodykę badań, podsumowała wyniki i przedstawiła wnioski końcowe. Spis literatury do sekcji *Omówienie* zawiera 64 pozycje, przy czym nie ma w tekście odwołania do dwóch pozycji (Becker i in. 2015; Dunselman i in. 2014), a wspominana w tej sekcji publikacja autorstwa Horne i in. 2014 nie znalazła się w spisie literatury. Dobór literatury jest jak najbardziej odpowiedni i bezpośrednio powiązany z problematyką pracy, co świadczy o dobrej orientacji Doktorantki w badanej tematyce. Rozprawa doktorska została przygotowana bardzo starannie i estetycznie pod względem edytorskim, a jeśli chodzi o poprawność formalno-językową, stylistyczną czy interpunkcyjną, to nie mam zastrzeżeń.

Wybór tematyki badań podjęty przez Panią mgr Katarzynę Sołkiewicz uważam za słuszny i w pełni uzasadniony. Endometrioza, charakteryzująca się ektopowym rozrostem endometrium w środowisku pozamacicznym, jest jedną z najbardziej znanych chorób kobiecego układu rozrodczego. Na całym świecie endometrioza dotyka prawie 10% kobiet w wieku rozrodczym i powoduje ona znaczny spadek jakości ich życia, włączając w to niekorzystny wpływ na płodność. Pomimo szeroko zakrojonych badań dotyczących endometriozy prowadzonych na przestrzeni ostatnich lat, mechanizm jej patogenezy pozostaje nadal niejasny. Za czynniki odpowiedzialne za rozwój i progresję choroby uważa się uwarunkowania hormonalne, zmiany zachodzące w układzie immunologicznym, stany zapalne, a ostatnio coraz częściej bierze się pod uwagę również czynniki metaboliczne. Z uwagi na etiologię endometriozy wiążąc tę chorobę z zaburzeniami funkcjonowania układu immunologicznego, wybór IgG jako obiektu badań oceniam jako trafny, a ideę analizy profilu i stopnia N- i O-glikozylacji IgG w powiązaniu z zaawansowaną endometriozą za oryginalną i nowatorską, zwłaszcza w kontekście braku markerów biochemicznych o wysokiej czułości i swoistości, które mogłyby być wykorzystywane w nieinwazyjnych badaniach przesiewowych. Zgodnie z najnowszymi wytycznymi z 2022 roku, do diagnostyki endometriozy zaleca się stosowanie ultrasonografii transwaginalnej i obrazowania z wykorzystaniem rezonansu magnetycznego. Glikozylacja, będąca jedną z najbardziej powszechnych modyfikacji białek, wpływa nie tylko na ich właściwości fizyko-chemiczne, ale też moduluje pełnione przez nie funkcje. Doktorantka w sekcji *Omówienie* opisała co

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Zakład Biochemii

Glikokoniugatów

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel.: 12 664 64 62

fax: 12 664 51 01

<http://www.uj.edu.pl/web/instytut-zoologii/jednostka/struktura/zaklad-biochemii-glikokoniugatow>



UNIwersytet  
JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

wiadomo o glikozylacji IgG i wspomniała o udokumentowanych zmianach w profilu glikozylacji IgG w przebiegu niektórych chorób autoimmunologicznych i nowotworowych. W tym miejscu chciałabym zwrócić uwagę, że jeśli chodzi ogólnie o O-glikozylację, to nie tylko N-acetylogalaktozoamina (GalNAc), jak napisała Doktorantka na str. 8, jest pierwszym monoracharydem dołączanym do reszt seryny i/lub treoniny. Faktycznie w najpowszechniejszym typie O-glikanów, czyli O-glikanach typu mucynowego, tak właśnie jest. Niemniej jednak w glikoproteinach, oprócz O-glikanów typu mucynowego, spotykane są inne typy O-glikanów, w których z resztami Ser/Thr jako pierwsze wiązane są reszty N-acetyloglukozoaminy, ksylozy, mannozy, glukozy lub galaktozy. Co więcej, najczęściej O-glikan jest przyłączony do reszt Ser lub Thr, ale w nielicznych przypadkach może on być też przyłączony do reszt hydroksylizyny i hydroksyproliny.

Definiując cele badań opisanych w rozprawie doktorskiej, Pani mgr Katarzyna Sołkiewicz wymieniła ich cztery (podrozdział *Cele badań*, str. 11). Moim zdaniem tylko trzeci z nich, to jest cytuję „*Określenie charakterystycznego dla zaawansowanej endometriozy profilu N- i O-glikozylacji surowiczej IgG oraz wytypowanie parametrów glikozylacji o wysokiej wartości klinicznej, które mogłyby stanowić dodatkowy marker diagnostyczny tej choroby*” stanowi faktycznie cel badań. Pozostałe raczej opisują jaką procedurę należałoby zastosować, aby móc z całą pewnością stwierdzić, że istnieje (lub nie) swoisty wzór N- i/lub O-glikozylacji IgG, który mógłby być potencjalnym nieinwazyjnym markerem diagnostycznym zaawansowanej endometriozy, a co więcej byłby on na tyle czuły i swoisty, że można byłoby z niego korzystać pomijając pracochłonna i czasochłonną izolację IgG z surowicy. Zatem trzy pozostałe wymienione przez Doktorantkę cele, moim zdaniem, powinny znaleźć się w podrozdziale *Założenia badań*, w którym to *nota bene* trafnie zdefiniowano aspekty, na które należy zwrócić szczególną uwagę podczas podejmowania prób typowania jakiegokolwiek struktury glikanu IgG jako markery odróżniającego nie tylko pacjentki z zaawansowaną endometriozą od kobiet zdrowych, ale też od pacjentek z innymi schorzeniami ginekologicznymi. Co ciekawe, cele badawcze zostały poprawnie sformułowane w *Streszczeniach*.

Pani mgr Katarzyna Sołkiewicz prowadziła badania opisane w rozprawie doktorskiej wykorzystując surowice pochodzące od zdrowych kobiet (n = 19), pacjentek z zaawansowaną endometriozą, III-IV stadium (n = 40) oraz pacjentek z innymi schorzeniami ginekologicznymi (n = 36), a mediany wieku wynosiły odpowiednio 39 lat, 34 lata i 39 lat. Techniki badawcze stosowane w celu przeprowadzenia poszczególnych analiz zostały szczegółowo opisane w artykułach włączonych do rozprawy doktorskiej. Obejmowały one chromatografię powinowactwa na złożu Protein A/G-Sepharose w celu izolacji IgG z surowicy, dwie metody oznaczania stężenia IgG (bicynchoninową dla wyizolowanej IgG i turbidymetryczną dla surowiczej IgG) oraz zmodyfikowany test fazy stałej lektyno-ELISA z użyciem

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Zakład Biochemii

Glikokoniugatów

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel.: 12 664 64 62

fax: 12 664 51 01

<http://www.uj.edu.pl/web/instytut-zoologii/jednostka/struktura/zaklad-biochemii-glikokoniugatow>



UNIwersytet  
JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

panelu dziesięciu biotynylowanych lektyn w celu określenia profilu i stopnia glikozylacji IgG. Uzyskane wyniki poddano analizie korzystając z programu Statistica 13.3PL uznając za istotne statystycznie te o wartości  $p < 0,05$ . Wybór stosowanych metod do realizacji założonych celów należy uznać za słuszny z uwagi na fakt, że wyniki tych badań miały dać odpowiedź na pytanie o potencjalną możliwość wykorzystania zmian w profilu glikozylacji IgG do diagnozowania zaawansowanej endometriozы. Co prawda bardziej precyzyjny wgląd w strukturę glikanów IgG i zmiany ilościowe towarzyszące procesowi chorobowemu można by uzyskać wykorzystując technikę spektrometrię mas, ale typowe laboratorium diagnostyczne raczej nie będzie wyposażone w tak kosztowną aparaturę, a dodatkowo analiza takich wyników wymagałaby od diagnosty specjalistycznej wiedzy z zakresu glikobiologii. Z lektury *Dyskusji w Int. J. Mol. Sci.* wynika, że Doktorantka jest świadoma ograniczeń związanych ze specyficnością lektyn.

Sposób przedstawienia uzyskanych wyników i ich krytyczna analiza zostały już wcześniej ocenione przez Recenzentów i Edytorów czasopism, w których zostały opublikowane artykuły będące podstawą rozprawy doktorskiej, to jest w *Scientific Reports* (2021), *Journal of Inflammatory Research* (2022) i *International Journal of Molecular Sciences* (2022). Z obowiązku recenzenta zweryfikowałam czy informacje zamieszczone w podrozdziale *Podsumowanie otrzymanych wyników badań* są zgodne z danymi opublikowanymi w poszczególnych artykułach wchodzących w skład tematycznego cyklu i stwierdzam ich tożsamość. Artykuły są spójne pod względem tematycznym i metodycznym, wartościowe pod względem poznawczym. Dokumentacja graficzna uzyskanych wyników w postaci rycin i tabel jest czytelna i przejrzysta. Cenne jest wskazanie w dwóch z nich (*Sci. Rep.* i *Int. J. Mol. Sci.*) silnych stron badań i ich ograniczeń. Lektura publikacji była dla mnie satysfakcjonująca, a szczególnie interesująca była część *Dyskusji w J. Inflamm. Res.*, w której przedstawiono silny związek fukozytacji IgG ze stanem zapalnym. Mam trzy uwagi merytoryczne dotyczące glikozylacji. Po pierwsze w literaturze anglojęzycznej na określenie GlcNAc przedzielającej używa się zwrotu „*bisecting GlcNAc*” a nie „*intersecting GlcNAc*” (str. 75). Po drugie, PHL-L jest lektyną specyficznie rozpoznającą tylko te trzy-i/lub czteroantennowe N-glikany typu kompleksowego, które posiadają  $\beta$ 1,6-rozgałęzienia (str. 76). Prawdą jest, że O-glikozylacja zachodzi potranslacyjnie, ale N-glikozylację zapoczątkowuje przeniesienie *en block* prekursorowego oligosacharydu na resztę asparaginy w sekwencji Asn-X-Ser/Thr, co zachodzi ko-translacyjnie (str. 76). Wyniki przedstawione w tych artykułach mają charakter nowatorski i wnoszą istotne informacje na temat potencjalnych możliwości wykorzystywania gliko-markerów IgG do celów diagnostycznych. Ich opublikowanie w czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania świadczy o wysokiej wartości poznawczej.

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Zakład Biochemii

Glikokoniugatów

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel.: 12 664 64 62

fax: 12 664 51 01

<http://www.uj.edu.pl/web/instytut-zoologii/jednostka/struktura/zaklad-biochemii-glikokoniugatow>



UNIwersytet  
JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

Na podstawie przeprowadzonych badań Doktorantka sformułowała siedem wniosków końcowych, których moim zdaniem jest ich za dużo, a ponadto są one zbyt rozbudowane. Czytając tę część rozprawy doktorskiej chciałaby znaleźć krótkie odpowiedzi na następujące pytania:

1. Które z badanych gliko-epitopów mogłyby stać się w przyszłości potencjalnymi markerami o wysokiej wartości klinicznej w nieinwazyjnej diagnostyce endometriozy?
2. Czy podczas rutynowych oznaczeń gliko-markerów uzasadnione byłoby pominięcie etapu izolacji IgG z surowicy?
3. Jaka grupa kobiet powinna stanowić grupę odniesienia w diagnostyce endometriozy opartej na gliko-markerach?
4. Czy wytypowane gliko-epitopy pozwolą odróżnić pacjentki z endometriozą od pacjentek z innymi chorobami ginekologicznymi?

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Zakład Biochemii

Glikokoniugatów

Podobnie jak cele badań, wnioski końcowe są lepiej sformułowane w *Streszczeniach*.

W sekcji *Omówienie* brakuje mi podrozdziału *Dyskusja*, w którym Doktorantka mogłaby wykazać się syntetyczną interpretacją wszystkich uzyskanych przez siebie wyników na tle cytowanego piśmiennictwa oraz zbiorczego podsumowania przeprowadzonych badań. Co prawda w sekcji *Omówienie* znajduje się podrozdział *Podsumowanie otrzymanych wyników badań*, ale mamy osobne podsumowanie dla każdego z artykułów. Może należało uzyskane wyniki zebrać w tabeli, przedstawiającej jakie zmiany w reaktywności IgG z lektynami powoduje endometrioza i która z lektyn wykorzystywanych w badaniach mogłaby mieć znaczenie diagnostyczne. Ciekawym wnioskiem wynikającym z badań opisanych w niniejszej rozprawie doktorskiej jest wykazanie, że w przypadku diagnostyki endometriozy opartej na gliko-markerach właściwą grupę odniesienia powinny stanowić kobiety zdrowe bez jakiegokolwiek zdiagnozowanej choroby ginekologicznej i stanu zapalnego w obrębie narządów rodnych.

Po przeczytaniu rozprawy doktorskiej nasunęły mi się następujące pytania:

1. Z jakiego powodu liczebność grupy kobiet zdrowych, bez zdiagnozowanych chorób ginekologicznych jest dwukrotnie niższa niż dwóch pozostałych grup eksperymentalnych?
2. Zwyczajowo w badaniach biologicznych wykonuje się po trzy powtórzenia dla danej próby. Tymczasem podczas oznaczenie reaktywności IgG z lektynami w zmodyfikowanym teście fazy stałej lektyno-ELISA wykonywano tylko dwa powtórzenia. Co było tego powodem?
3. Zauważyłam, że oczyszczając IgG z surowicy na złożu Protein A/G-Sepharose stosowano dwa podejścia, albo od razu nakładano surowicę na kolumnę (0,5 ml), albo przed nałożeniem rozcieńczano ją 1:1 50 mM TBS i nakładano 1 ml. Czym była uzasadniona taka modyfikacja metody?

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel.: 12 664 64 62

fax: 12 664 51 01

<http://www.uj.edu.pl/web/instytut-zoologii/jednostka/struktura/zaklad-biochemii-glikokoniugatow>



UNIwersytet  
JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

4. Które lektyny zdaniem Doktorantki wydają się być najbardziej obiecujące, jeśli chodzi o ich potencjalną możliwość wykorzystywania w testach diagnostycznych endometriozy opartych na detekcji gliko-markerów?

### Wniosek końcowy

W podsumowaniu pragnę stwierdzić, że pomimo moich krytycznych uwag, bardzo wysoko oceniam wartość merytoryczną rozprawy doktorskiej Pani mgr Katarzyny Sołkiewicz. Stanowi ona oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, a uzyskane wyniki są interesujące i wnoszą istotny wkład w poznanie molekularnych mechanizmów towarzyszących endometriozie, a wytypowane gliko-markery mogą stanowić punkt wyjścia do dalszych badań mających na celu poszukiwanie nieinwazyjnych markerów tej choroby. Doktorantka udowodniła, że potrafi samodzielnie rozwiązać sformułowany problem badawczy poprzez odpowiednie zaplanowanie i wykonanie cyklu eksperymentów, krytyczną analizę uzyskanych wyników oraz wyciągnięcie wyważonych wniosków.

Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Katarzyny Sołkiewicz pod tytułem „*Analiza profilu i stopnia glikozylacji surowiczej immunoglobuliny G u kobiet z zaawansowaną endometriozą*” spełnia wszelkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w artykule 187 ust. 1-4 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz. U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.). W związku z powyższym, wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie Pani mgr Katarzyny Sołkiewicz do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Biorąc pod uwagę złożoność i kompleksowość prowadzonych badań, wysoką wartość merytoryczną i oryginalność wyników oraz wysoką sumaryczną wartość współczynnika oddziaływania artykułów tworzących cykl tematyczny (15,835) rekomenduję wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Katarzyny Sołkiewicz stosowną nagrodą.

Kraków, 06.06.2023 r.

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Zakład Biochemii

Glikokoniugatów

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel.: 12 664 64 62

fax: 12 664 51 01

<http://www.uj.edu.pl/web/instytut-zoologii/jednostka/struktura/zaklad-biochemii-glikokoniugatow>