



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ

im. Ludwika Hirsztfelda

POLSKIEJ AKADEMII NAUK

LABORATORIUM IMMUNOLOGII ROZRODU

ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław

tel. (+48) 337 11 72 wew. 358

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Ewy Janiszewskiej pt.: "Zmiany glikozylacji klasteryny oraz ekspresji wybranych parametrów równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej jako potencjalne biomarkery obniżonej płodności męskiej" przedstawionej do obrony na Uniwersytecie Medycznym im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

1. Ocena formalna

Przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska jest oprawionym dokumentem zawierającym kopie 4 współautorskich artykułów w tym jednego przeglądowego i 3 oryginalnych, będących podstawą rozprawy, opatrzonych autorskim komentarzem i zawierającym oświadczenia współautorów prac oryginalnych oraz podsumowanie dorobku doktorantki. Analiza oświadczeń współautorów wskazuje na kluczowy udział doktorantki w realizacji technicznej i merytorycznej części badań. Praca została wykonana w Katedrze Diagnostyki Laboratoryjnej w Zakładzie Diagnostyki Laboratoryjnej, Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu pod kierunkiem Pani dr hab. Ewy Marii Kratz. Artykuły stanowiące podstawę pracy w tym:

1. Janiszewska E, Kratz EM. Could the glycosylation analysis of seminal plasma clusterin become a novel male infertility biomarker? Mol Reprod Dev. 2020 May;87(5):515-524. doi: 10.1002/mrd.23340. Epub 2020 Mar 28. PMID: 32222009.
2. Janiszewska E, Kokot I, Gilowska I, Faundez R, Kratz EM. The possible association of clusterin fucosylation changes with male fertility disorders. Sci Rep. 2021 Aug 2;11(1):15674. doi: 10.1038/s41598-021-95288-w. PMID: 34341430; PMCID: PMC8329075.
3. Janiszewska E, Kokot I, Kmieciak A, Stelmasiak Z, Gilowska I, Faundez R, Kratz EM. The Association between Clusterin Sialylation Degree and Levels of Oxidative-Antioxidant Balance Markers in Seminal Plasmas and Blood Sera of Male Partners with Abnormal Sperm Parameters. Int J Mol Sci. 2022 Sep 13;23(18):10598. doi: 10.3390/ijms231810598. PMID: 36142505;
4. Janiszewska E, Kokot I, Kmieciak A, Gilowska I, Faundez R, Kratz EM. Are There Associations between Seminal Plasma Advanced Oxidation Protein Products and

Selected Redox-Associated Biochemical Parameters in Infertile Male Patients? A Preliminary Report. *Cells*. 2022 Nov 18;11(22):3667. doi: 10.3390/cells11223667. PMID: 36429095;

zostały opublikowane w czasopiśmie z listy JCR o wysokich wskaźnikach bibliometrycznych. Pani mgr Magdalen Janiszewska jest pierwszą autorką we wszystkich pracach. Edytorskie przygotowanie rozprawy doktorskiej jest bardzo staranne i zasługuje na wyróżnienie.

2. Ocena osiągnięcia naukowego

Niepłodność u mężczyzn stanowi kliniczny i społeczny problem. Uważa się, że dotyka ona od 2,5 – 12% populacji mężczyzn a wśród par niepłodnych jest stwierdzana w 50%. Zmieniające się wraz z latami zalecane przez WHO normy oceny nasienia jasno wskazują obniżenie wartości wskaźników uznawanych za prawidłowe, co z jednej strony wskazuje na globalne tendencje zmniejszonej płodności z drugiej zaś mogą świadczyć o procesach adaptacyjnych do najprawdopodobniej zmieniających się warunków środowiskowych. Jednocześnie techniki rozrodu wspomaganego pozwoliły zwiększyć prawdopodobieństwo posiadania genetycznych dzieci u par o obniżonej płodności w tym u tych, u których czynnik męski jest dominujący. W ustalaniu przyczyn niepłodności u mężczyzn podstawowe badanie nasienia pozostaje złotym standardem. Badanie to koncentruje się przede wszystkim na ocenie liczby, morfologii i ruchu plemników.

Niedocenionym jednak źródłem informacji o środowisku plemników pozostaje plazma nasienia. Jest to płyn ustrojowy bogaty w białka szczególnie glikoproteiny, hormony, jony metali, enzymy, prostaglandyny, kwasy nukleinowe i inne substancje, który podczas naturalnego aktu zapłodnienia pełni rolę wspomagającą ułatwiając ruch plemników, chroniąc ich żywotność w tym poprzez procesy interakcji z komórkami nabłonka błony śluzowej narządu rozrodczego, chroni przed przedwczesną kapacytacją plemników, pełni rolę immunomodulującą i stanowi ochronę plemników przed stresem oksydacyjnym.

Jednak jak wskazują wyniki zabiegów sztucznej inseminacji i zapłodnienia pozaustrojowego plazma nasienia nie jest niezbędna do prawidłowego łączenia się plemników z komórką jajową. Z drugiej strony, niektóre doniesienia jednoznacznie wskazują, że jej obecność w drogach rodnych kobiety ułatwia implantację i wczesny rozwój zarodków.

Dlatego nadal pozostają aktualne i ważne badania nad udziałem składników plazmy nasienia w utrzymaniu prawidłowej funkcji plemników. Badania podjęte przez panią mgr Ewę Janiszewską nad klasteryną- glikoproteiną obficie występującą w plazmie nasienia i nad jej a także innych białek potencjałem anty- oksydacyjnym wpisują się w nurt współczesnej seminologii.

Klasteryna jest białkiem o wielu właściwościach i funkcjach, dzięki którym białko to z jednej strony może brać udział w ochronie komórek układu rozrodczego w tym plemników przed uszkodzeniem z drugiej zaś strony dysfunkcje lub zmienny fenotyp tego białka mogą być

przyczyną patologii nasienia i / lub innych komórek biorących udział w dojrzewaniu plemników .

Spośród wielu potencjalnych oddziaływań klasteryny z komórkami autorka dysertacji postanowiła zbadać związek pomiędzy występowaniem klasteryny, stopniem i rodzajem glikozylacji i jej udziałem w utrzymaniu potencjału anty-oksydacyjnego w nasieniu charakteryzującym się różnym rodzajem patologii plemników.

Praca przeglądowa rozpoczynająca cykl prac będących przedmiotem dysertacji jest ważnym wprowadzeniem do doświadczalnej części pracy i jednoznacznie wskazuje na usytuowanie przeprowadzonych eksperymentów w obszarze badawczym zespołu o uznanej renomie i w pełni ukształtowanym warsztacie. Jednocześnie wskazuje na bardzo dobre przygotowanie doktorantki do prowadzonych badań co jest widoczne w tej pracy ale również w dyskusji każdego oryginalnego artykułu.

Autorka dysertacji podjęła się bardzo trudnego zadania za względu na wielofunkcyjność klasteryny i jej ubikwitarność. To powoduje, że uchwycenie prostych zależności np. pomiędzy stężeniem i oceną seminologiczną nasienia może nie dawać jednoznacznych interpretacji. Wskazują na to wyniki uzyskane w pierwszej pracy oryginalnej dotyczące zależności pomiędzy stężeniem klasteryny w plazmie nasienia i surowicy krwi pacjentów charakteryzujących się nasieniem o zróżnicowanej ocenie seminologicznej.

Dlatego słusznie podjęto badania nad stopniem i rodzajem glikozylacji klasteryny w określonych typach patologii nasienia zawężając w ten sposób zakres potencjalnych oddziaływań. Badano stopień fukozytacji i sialilacji klasteryny w plazmie nasienia i w surowicy krwi a także stężenie niektórych enzymów, stężenie żelaza i pojemność antyoksydacyjną na podstawie oceny wartości TAS i FRAP.

Okazało się jednak, że tylko fukozytacja surowiczej klasteryny jest istotnie zróżnicowana w zależności od oceny seminologicznej natomiast nie różni się w próbkach plazmy nasienia. Zmiany w stopniu i charakterze glikozylacji surowiczej klasteryny u pacjentów ze zmienionymi parametrami nasienia mogą wskazywać, jak sugeruje autorka, ogólnoustrojowe przyczyny niepłodności mężczyzn, które coraz częściej są brane pod uwagę w dochodzeniu przyczyn tego stanu. W mojej ocenie obserwacja ta jest najważniejszym osiągnięciem tej pracy.

W przypadku oceny sialilacji klasteryny w plazmie nasienia różnice zaobserwowano w grupie pacjentów z oligoastenozoospermia w porównaniu do pozostałych badanych grup, w przypadku reakcji glikanów klasteryny z lektyną *Maackia amurensis* (MAA) podobnie jak w przypadku współczynnika sialilacji MAA/SAA w stosunku do patologii wyrażającej się asthenozoospermia i teratospermia (AT i T). Podobne tendencje wskazujące na zmianę sialilacji klasteryny zaobserwowano w surowicy krwi w przypadku wiązania lektyny SNA do alfa2,6 glikanów wskazując, że silne upośledzenie funkcji plemników objawiające się asthenooligoospermia może mieć związek z upośledzeniem procesu glikacji klasteryny. Jest to silna przesłanka do prowadzenia dalszych badań nad udziałem klasteryny i jej glikozylowanych form w dochodzeniu przyczyn niepłodności u mężczyzn.

Wyniki badania potencjału anty- oksydacyjnego nie były jednoznaczne pomimo zaobserwowanych korelacji pomiędzy stężeniem białek SIRT3 i SIRT5. Nie mniej jednak staranna analiza statystyczna oparto o analizę korelacji, analizę krzywych ROC i analizę

skupień pozwoliła na zaobserwowanie zależności pomiędzy stopniem i rodzajem glikozylacji klasteryny, potencjałem anty-oksydacyjnym i niektórymi patologiami nasienia.

Ostatni artykuł oryginalny z cyklu prac jest całkowicie poświęcony badaniu związku pomiędzy stężeniem zaawansowanych produktów utleniania białek i niektórymi podstawowymi parametrami biochemicznymi plazmy nasienia i obserwowaną patologią nasienia .

Artykuł potwierdza znany fakt niekorzystnego wpływu stresu oksydacyjnego na funkcje plemników ale jednocześnie wskazuje, że oznaczenia podstawowych parametrów biochemicznych plazmy nasienia takich jak poziom białka całkowitego czy żelaza mogą być dodatkową wskazówką diagnostyczną w badaniach seminologicznych potwierdzając tezę postawioną przez doktorantkę o niewykorzystaniu plazmy nasienia jako dodatkowego źródła informacji diagnostycznych w badaniu nasienia.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiony do recenzji cykl prac jest logicznie uporządkowanym przedstawieniem konsekwentnie prowadzonych i dobrze udokumentowanych wyników badań, choć ostania praca nieco wymyka się narzuconej logice tego cyklu.

Ranga czasopism, w których zostały opublikowane wskazuje, że zewnątrzni recenzenci również uznali ich wartość. Praca wnosi nową wiedzę o glikozylacji klasteryny w dwóch kompartmentach organizmu niepłodnych mężczyzn i może stanowić cenne uzupełnienie seminologicznych metod diagnostycznych.

3. Uwagi końcowe

Opublikowane wyniki badań skłaniają jednak do kilku pytań i uwag, które pozwolę sobie przedstawić poniżej:

- klasteryna jest białkiem o wielu funkcjach w tym w ochronie komórek przed stresem oksydacyjnym. W jaki zatem sposób zmiany glikozylacji klasteryny mogą wywierać ochronny wpływ na plemniki ?
- czy badanie polimorfizmu genów fukozylotransferaz mogłoby wyjaśnić zmiany stopnia glikozylacji klasteryny u niepłodnych mężczyzn?
- czy zastosowana technika badania obecności reszt cukrowych rzeczywiście jest odzwierciedlaniem naturalnej ekspozycji cukrów? Czy związanie klasteryny z płytką w przebiegu lektynowego testu ELISA poprzez przeciwciało anty-klasterynie nie zmienia dostępności cukrów ?

Zawarte powyżej uwagi i pytania nie umniejszają wartości merytorycznej pracy. Mam nadzieję, że wyjaśnienie ich przez autorkę będzie dla Niej pomocą w dalszym planowaniu badań i rozwoju kariery naukowej.

4. Podsumowanie

Stwierdzam, że rozprawa doktorska **mgr Ewy Janiszewskiej pt.: ” Zmiany glikozylacji klasteryny oraz ekspresji wybranych parametrów równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej jako potencjalne biomarkery obniżonej płodności męskiej ”** spełnia

warunki określone w art. Art .187 ust.1-4 Ustawy z dnia 20 lipca 2018r Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz. U.2018 poz.1668) i zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie Pani mgr Ewy Janiszewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego .

Jednocześnie zwracam się z wnioskiem o wyróżnienie rozprawy.

Prof. . dr hab. Anna Chelmońska-Soyta

