

dr hab. Dorota Hoja-Łukowicz, prof. UJ

☎ (+48) 12 664 64 66

E-mail: dorota.hoja-lukowicz@uj.edu.pl



UNIwersytet  
JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

Uniwersytet Jagielloński w Krakowie Biuro Rektora Uniwersytetu	
wpł. dnia	27-11-2020
L. dz. Riv-0	1595/2020

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr ANNY KAŁUŻY

pt.

„Analiza sjalilacji N-glikomu plazmy męskiego nasienia, ze szczególnym uwzględnieniem  
swoistego antygeny sterczewego”

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Katedra Fizjologii Zwierząt

Zakład Biochemii

Glikokoniugatów

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została wykonana pod kierunkiem dr hab. Mirosławy Ferens-Sieczkowskiej, prof. nadzw. w Katedrze i Zakładzie Chemii i Immunochemii, Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Zespół Pani Profesor od wielu lat zajmuje się analizą profilu glikozylacji białek ludzkich płynów ustrojowych. Priorytetowym obszarem badawczym jest analiza plazmy nasienia mężczyźni o zaburzonej obrazie spermatogenezy oraz poszukiwanie cukrowych markerów męskiej niepłodności o immunomodulacyjnym wpływie na żeński układ rozrodczy.

Według szacunkowych danych Światowej Organizacji Zdrowia WHO, 15-20% par w okresie rozrodczym boryka się z problemami związanymi z poczęciem potomstwa. Około połowa tych przypadków związana jest z niepłodnością męską lub obniżonym potencjałem rozrodczym mężczyzny. Podstawowym testem diagnostycznym do oceny czynnika męskiego rekomendowanym przez WHO jest standardowe badanie nasienia, polegające na ocenie liczby, ruchliwości i budowy plemników. Jednak ze względu na dużą zmienność osobniczą populacji ludzkiej oraz wpływ czynników środowiskowych, uwzględniane w teście parametry fizjologiczne nie są wystarczające do określenia zdolności plemników do zapłodnienia, a już w zupełności nie wyjaśniają przyczyn niepłodności idiopatycznej. Dlatego też pogłębione badania biochemiczne czy molekularne są niezbędne do zaproponowania nowych kryteriów oceny poszczególnych składników nasienia, zauważenia korelacji pomiędzy nimi i wytypowania nowych markerów diagnostycznych. Wiadomo, że wszelkim zmianom patologicznym towarzyszą zmiany we wzorze glikozylacji glikoprotein, a te z kolei wpływają na oddziaływanie typu komórka-komórka, komórka-białko oraz białko-białko. Plazma nasienia bogata jest w glikoproteiny a stanowiąc naturalne środowisko dla komórek rozrodczych może bezpośrednio lub pośrednio wpływać na przebieg procesu zapłodnienia. Wiele badań potwierdza, że plazma nasienia wspomaga funkcje plemników, moduluje matczyną odpowiedź immunologiczną i ułatwia implantację zarodka ludzkiego. Mimo wielu publikacji na temat przyczyn niepłodności męskiej nadal nie mamy wystarczającej wiedzy, aby powiązać zmiany profilu i stopnia glikozylacji białek plazmy nasienia z potencjałem rozrodczym mężczyźni. Dlatego też podjęty przez Doktorantkę temat jest bardzo aktualny i ważny zarówno z poznawczego, medycznego jak i społecznego punktu widzenia.

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>

## OMÓWIENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ ORAZ PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W JEJ SKŁAD

Na przedstawioną do oceny rozprawę doktorską składają się trzy oryginalne i spójne tematycznie prace eksperymentalne – wszystkie opublikowane w renomowanych czasopismach z bazy JCR o łącznej wartości współczynnika oddziaływania 9,153; a zatem przedstawione wyniki były już poddane surowej ocenie recenzentów. We wszystkich publikacjach mgr Anna Kałuża jest pierwszym autorem, a zakres i wkład pracy w ich powstanie świadczą o jej wiodącej roli i posiadaniu dogłębnej wiedzy tematycznej oraz bardzo dobrym opanowaniu złożonego i nowoczesnego warsztatu badawczego z zakresu biochemii czy technik spektroskopowych. Analiza części cukrowych glikoprotein jest poważnym wyzwaniem dla badacza ze względu na dużą złożoność strukturalną oligosacharydów i wymaga użycia różnorodnych i zaawansowanych technik analitycznych oraz narzędzi informatycznych. Analizy takie zawsze wymagają ogromnego nakładu pracy i czasu.

Zbiór artykułów poprzedzony jest sześcioma rozdziałami: WSTĘP, CEL PRACY, MATERIAŁY I METODY BADAŃ, WYNIKI, DYSKUSJA I WNIOSKI. Następnie zamieszczone jest PIŚMIENICTWO, STRESZCZENIA w języku polskim i angielskim, CURRICULUM VITAE oraz OŚWIADCZENIA WSPÓLAUTORÓW.

We WSTĘPIE Pani mgr Anna Kałuża rzeczowo i przekonująco uzasadnia wybór podjętej problematyki badawczej. Następnie charakteryzuje składniki plazmy nasienia, w szczególności swoisty antygen sterczowy PSA. Opisuje budowę strukturalną PSA z uwzględnieniem mikroheterogenności wynikającej z różnorodności strukturalnej oligosacharydów przyłączonych do asparaginy w pozycji 69. Ilustracją profilu glikozylacji jest Rycina 2, na której Doktorantka umieściła siedem głównych struktur, przy czym struktura 5 nie należy do typu hybrydowego jak podaje Autorka, lecz jest to struktura jednoantenowa typu kompleksowego. Następnie Doktorantka szczegółowo opisuje proteolityczne działanie PSA w procesie upłynnianiu skoagulowanego ejakulatu i podkreśla, że nieprawidłowy przebieg tego procesu koreluje z problemami męskiej płodności. Pozostałe dwa podrozdziały WSTĘPU to opisy dwóch głównych technik wykorzystywanych w badaniach – techniki spektrometrii mas oraz lektynoblotingu. Na podkreślenie zasługuje przedstawiony opis działania spektrometru mas, kryteriów doboru sposobu jonizacji, wyboru analizatora i detektora mas, gdyż świadczy o bardzo dobrej znajomości teoretycznej i praktycznej tej techniki, jak również o rozumieniu jej zalet i ograniczeń. CEL PRACY został sformułowany właściwie z podziałem na zadania. Badania wykonano na próbkach plazmy nasienia pobranych od pacjentów ze stwierdzoną niepłodnością. Partnerki pacjentów zostały przebadane w kierunku wykluczenia żeńskiego czynnika niepłodności. Grupę kontrolną stanowiły próbki plazmy nasienia mężczyzn o potwierdzonym ojcostwie. Zgromadzono ponad sto próbek, co pozwoliło na statystyczne opracowania wyników. Użyto adekwatnych testów statystycznych. Przeprowadzone badania zilustrowano poglądowymi, starannie przygotowanymi rycinami (MATERIAŁY I METODY BADAŃ). DYSKUSJA została napisana wyczerpująco i zakończona wytyczeniem kolejnego kierunku badań. WNIOSKI sformułowano prawidłowo. PIŚMIENICTWO zawiera 53 pozycje literaturowe, głównie z ostatnich dziesięciu lat.

Pierwsza praca eksperymentalna wchodząca w skład rozprawy doktorskiej dotyczy analizy porównawczej wzoru N-glikomów plazmy nasienia pacjentów niepłodnych i płodnych z użyciem spektrometru mas. W celu wyeliminowania fizjologicznych różnic międzypersonalnych, analizie poddano 5 próbek będących równocennymi pod względem ilości białka całkowitego mieszaninami osiemnastu plazm nasienia w obrębie poszczególnych grup: normozoospermiczni płodni, normozoospermiczni niepłodni, oligozoospermiczni, astenozoospermiczni i oligoastenozoospermiczni pacjenci. Wyizolowane pule glikanowe poddano permetylacji, co w dużej mierze wyrównało podatność poszczególnych struktur na



UNIwersytet  
JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Katedra Fizjologii Zwierząt

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

jonizację i pozwoliło na przeprowadzenie analizy ilościowej/półilościowej. Opracowanie wyników przedstawiono jako stosunek analizowanej cechy glikanu do zawartości wszystkich glikanów, obliczony jako wartość średnia intensywności odpowiednich pików  $\pm$  SD na podstawie trzech powtórzeń technicznych. W opisie wyników rozprawy doktorskiej (str. 25-26), zamiast rycin i tabeli przeklejonych wprost z publikacji, bardziej pomocna w śledzeniu analizy i obliczeń byłaby tabela zbiorcza wyników otrzymanych metodą MS zawierająca zbiory zidentyfikowanych dla każdej próbki glikanów, podzielonych na poszczególne typy strukturalne z przypisanymi do nich wartościami m/z i intensywnościami pików. Bez tych danych niemożliwe jest sprawdzenie poprawności obliczeń składów procentowych i stopnia fukozytacji poszczególnych próbek. Generalnie, im większa wartość m/z tym więcej możliwych izomerycznych struktur można przypisać do sumarycznego wzoru oligosacharydu, np. dla oligosacharydu o m/z 1590 teoretycznie możliwych jest kilka struktur - struktury jednoantenowe typu kompleksowego z fukozą korową lub antenową i jedna struktura z niską zawartością mannozy (*ang.* paucimannose), fukozą korową oraz z przedzielającym GlcNAc. Z kolei, do jonu m/z 1621 można przypisać strukturę jednoantenową typu kompleksowego (przedstawiona w Tabeli 1) oraz strukturę typu hybrydowego. Dlatego też, niezrozumiałym jest dlaczego Doktorantka uznała, że tylko oligosacharydy o m/z: 2592, 2953, 3041, 3215, 3577 i 3839 mogą występować w większej liczbie struktur. W rzeczywistości, wszystkich możliwych struktur nie jest 86, ale co najmniej 86. Jest to o tyle ważne, że przedstawione w publikacji i powtórzone w opisie wyników sumaryczne liczby struktur z (i) co najmniej jedną resztą kwasu sjałowego (jest 29, a powinno być 32), (ii) całkowicie sjałowane (jest 5, a powinno być 10 – struktury kompleksowe i hybrydowe), (iii) z fukozą korową (jest 57, a powinno być 63) nie są adekwatne do omawianego zbioru 86 struktur (Fig. 2, publikacja 1). Niezrozumiałe też są wyliczenia dotyczące struktur hybrydowych. Doktoranta podaje 15 struktur typu hybrydowego w zbiorze 86 struktur, podczas gdy przedstawionych jest 14, a cztery struktury uznawane za hybrydowe i określane jako struktury z „jedną odsłoniętą mannozą korową” to w rzeczywistości jednoantenowe struktury typu kompleksowego. Fakt ten stwarza przypuszczenie, że obliczone względne zawartości struktur wielomannozowych i hybrydowych w poszczególnych próbkach mogą być obarczone błędem (Fig. 4, publikacja 1). Wobec tego, słuszniej było przedstawienie obliczeń dla struktur wielomannozowych z pominięciem struktur hybrydowych. Nie jest też wyjaśnione, dlaczego w rozważaniach co do sposobu wiązania fukozy w antenach pominięto obecność antygenu H, LeA oraz LeB, skoro tylko dla niektórych jonów zweryfikowano budowę strukturalną na podstawie fragmentacji (str. 28, linijka 18). Ponadto, z wcześniejszych badań wynika, że zarówno antygen H jaki i struktury Lewis typu 1 są obecne na glikoproteinach plazmy nasienia (Lerrer et al. 2005; Saraswat et al. 2016).

Podsumowując, z całkowitą pewnością można stwierdzić, że we wszystkich próbkach dominowały glikany typu kompleksowego, najliczniej reprezentowane przez struktury dwuantenowe. Fukozyłacja i sjałilacja anten zarówno w strukturach kompleksowych jak i hybrydowych wzajemnie się wykluczały. Co ciekawe, poszczególne próbki były wyraźnie zróżnicowane pod względem obecności struktur wieloantenowych (3-4 anteny), silnie sjałowanych (co najmniej 3 reszty kwasu sjałowego) lub wysoko fukozyłowanych (co najmniej 3 reszty fukozy). Zawartość wieloantenowych glikanów była 3-krotnie wyższa u niepłodnych mężczyzn z normozoospermią, podczas gdy ekspresja wysokofukozyłowanych oligosacharydów, z wielokrotnie powtarzającymi się glikoepitopami typu Lewis, była zwiększona w próbkach astenozoospermicznych, oligozoospermicznych i oligoastenozoospermicznych. Z kolei silna sjałilacja charakteryzowała oligosacharydy niepłodnych osobników z normozoospermią. U pacjentów z astenozoospermią nie zidentyfikowano wysokosjałowanych oligosacharydów; obecne były jedynie dwa piki (m/z 2674 i 3577), do których przypisano struktury trzyantenowe z jedną resztą kwasu sjałowego.

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Katedra Fizjologii Zwierząt

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

Doktorantka określiła również indeks fukozytacji dla wieloantennowych struktur typu kompleksowego w każdej z próbek. Nie jest jasne dlaczego w obliczeniach nie uwzględnia intensywności pików odpowiadających strukturom z siedmioma i ośmioma resztami fukozy. Na podkreślenie zasługuje fakt, że omawiana publikacja jest pierwszym doniesieniem wiążącym różnice w N-glikomie plazmy nasienia z potencjałem rozrodczym i przybliża do wytypowanie nowych biomarkerów diagnostycznych niepłodności męskiej. Jak zauważa Pani mgr Anna Kałuża, jednym z nich może być zmniejszona sjalilacja u pacjentów z obniżoną liczbą i/lub ruchliwością plemników, w szczególności u pacjentów z astenozoospermią i równocześnie znacznie podwyższona zawartość N-glikanów silnie rozgałęzionych i silnie sjalowanych u pacjentów normozoospermicznych z niewyjaśnioną przyczyną niepłodności.

Różnicujący poziom sjalilacji poszczególnych próbek stał się inspiracją do pogłębionych badań nad typem wiązania kwasu sjalowego. Badania te przedstawiono w publikacji 2. Analizie poddano 113 próbek osocza nasienia – 10 próbek kontrolnych oraz 103 próbki pochodzące od pacjentów z zaburzoną liczbą i/lub ruchliwością plemników. Każdą próbkę analizowano oddzielnie stosując technikę lektynoblotingu z użyciem lektyn z *Maackia amurensis* – MAA oraz z *Sambucus nigra* – SNA. Wykonano analizę densytometryczną (półilościową) zwizualizowanych prążków po reakcji z lektynami i określono stosunki intensywności zabarwienia w reakcji z lektyną do zawartości białka w danym prążku, oszacowanej na podstawie proteinogramu próbki.

Studiując przedstawione wyniki nasunęło mi się szereg pytań i spostrzeżeń:

1. Czy w metodzie lektynoblotingu były wykonane próby kontrolne w celu wyeliminowania fałszywie pozytywnych reakcji, tj. próba potwierdzająca specyficzność wiązania lektyny, czyli reakcja z lektyną blokową monosacharydem (0.4 M SA) lub 200 mM kwas octowy, czy też odpowiednią glikoproteiną posiadającą reszty cukrowe rozpoznawane przez lektynę (np. transferyna dla SNA i fetuina lub glikoforyna dla MAA) celem potwierdzenia braku oddziaływań niespecyficznych zachodzących przez hydrofobowe obszary lektyny i białka/białek prążka? Czy została wykonana próba kontrolna z użyciem jedynie ExtrAvidyny sprzężonej z AP w celu wyeliminowania reakcji z endogenną biotyną? Wykonanie powyższych prób kontrolnych jest o tyle ważne, że w przypadku zaobserwowania detekcji niespecyficznej, do badań proteomicznych należałoby użyć próbek wzbogaconych w sjaloglikoproteiny metodą chromatografii lektynowej ze specyficzną desorpcją 0.4 M kwasem sjalowym.

2. MAA rozpoznaje kwas sjalowy  $\alpha$ 2,3-związany do Gal w N- i O-glikanach. Z kolei, SNA wykazuje reaktywność względem kwasu sjalowego  $\alpha$ 2,6-związanego do Gal w N-glikanach oraz do GalNAc w O-glikanach (<https://vectorlabs.com>), a nie jak podaje Doktorantka tylko do Gal (str. 28 rozprawy doktorskiej). Gdyby Pani mgr Anna Kałuża zastosowała trawienie N-glikozydazą F przed lektynoblotingiem, to mogłaby oddzielenie przeanalizować sjalilację N-glikoprotein oraz O-glikoprotein, a w przypadku tych pierwszych wyniki przedyskutować w świetle wyników opisanych w publikacji 1.

3. W reakcji z lektyną SNA na blocie pod prążkiem o masie cząsteczkowej 83 kDa wyraźnie widać drugi prążek, którego nie ma w reakcji z lektyną MAA. Dlaczego został on pominięty w analizie proteomicznej? Można było wyciąć fragment żelu na podstawie reakcji z SNA na blocie i zidentyfikować białka metodą LC-MS.

4. W publikacji (Fig. 1) Doktorantka wyszczególnia prążek o masie cząsteczkowej 41 kDa jako SNA-pozytywny i go analizuje (Suplementarny Fig. 2), natomiast w rozprawie doktorskiej stwierdza, że prążek 41 kDa reaguje tylko z MAA a reagującemu z SNA przypisuje masę cząsteczkową 45 kDa (str. 29, linijka 13 od dołu). Z porównania wzorów lektynoblotingów z

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Katedra Fizjologii Zwierząt

Zakład Biochemii

Glikokoniuatów

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-glikokoniuatow>





UNIWERSYTET  
JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

użyciem SNA i MAA widać wyraźnie, że omawiany prążek lokalizuje się pomiędzy prążkami o masach cząsteczkowych 41 i 45 kDa. Zatem jest to dodatkowy prążek niewidoczny w barwieniu białek po rozdiale elektroforetycznym, ale silnie SNA-pozytywny. Dlaczego prążek ten nie był poddany analizie proteomicznej?

5. Na wykresach pudełkowych widać znaczny rozrzut danych, pomimo dołożonych wszelkich starań do wystandaryzowania ilości białka w prążkach elektroforetycznych względem znanych ilości BSA i natężenia barwy SyproRuby oraz wyznaczenia arbitralnych jednostek określających reaktywność danej lektyny. Rozrzut danych, jak zauważa Doktorantka, może wskazywać na zmienność osobniczą. Jednak może też wynikać z różnej liczebności grup badanych czy też nakładania się błędów w pomiarach densytometrycznych związanych z odrębnym ładowaniem próbek do barwienia na białko i do reakcji z lektyną, czy też wykonanymi rozcieńczeniami służącymi standaryzacji. Lepszym rozwiązaniem byłoby użycie stain-free żeli, ale takie podejście niestety wymaga odpowiedniego detektora do zebrania obrazu i jego analizy.

6. W rozprawie doktorskiej powinna być zamieszczona tabela ze zidentyfikowanymi glikoproteinami metodą LC-MS uwzględniająca jedynie prążki białkowe SNA- i MAA-reaktywne oraz nie powinna być wymieniona glikodelina, gdyż nie jest rozpoznawana przez żadną z użytych sjałoreaktywnych lektyn (prążek o masie cząsteczkowej 21 kDa) (str. 31, linijka 26).

Na podstawie badań proteomicznych, Doktorantka wytypowała do dalszych badań antygen specyficzny dla prostaty PSA. Osocze nasienne jest bogatym źródłem tej glikoproteiny, co stanowi ułatwienie w scharakteryzowaniu ewentualnych zmian w jej profilu glikozylacji. PSA zawiera jedno konserwatywne miejsce N-glikozylacji na asparaginie w pozycji 69. Ustalenie budowy strukturalnej oligosacharydów tego miejsca było celem wielu badań. I takich badań również podjęła się Pani mgr Anna Kałuża. Zaprezentowane w publikacji 3 badania zostały zaplanowane i wykonane z wielką starannością, z użyciem najnowocześniejszego sprzętu do spektrometrii mas. Doktorantka podjęła się ambitnego i nowatorskiego opracowania metody derywatyzacji kwasów sjałowych, umożliwiającej rozróżnienie izomerów wiązaniowych kwasu sjałowego przy zastosowaniu spektrometrii mas MALDI-FTICR-MS oraz MALDI-TOF-MS. Opracowana metoda charakteryzowała się wysoką powtarzalnością i przepustowością. Do badań mikroheterogenności glikozylacji antygeny swoistego dla prostaty PSA użyto 102 próbki osocza nasienia płodnych i niepłodnych mężczyzn. PSA związane z immunożelem, następnie trypsynizowano. Uwolnione peptydoglikany poddano dwuetapowej derywatyzacji prowadzącej do uzyskania stabilnych i zróżnicowanych pod względem masy cząsteczkowej, a więc rozróżnialnych w spektrometrii mas, pochodnych  $\alpha$ 2,3- i  $\alpha$ 2,6-związanego kwasu sjałowego. We wszystkich próbkach oznaczono ilościowo odpowiednio 44 oraz 22 glikopeptydy zawierające głównie struktury cukrowe dwu- lub jednoantenowe typu kompleksowego z pojedynczą resztą fukozy i jedną lub dwoma resztami kwasu sjałowego. Ponadto, zidentyfikowano jednostki LacdiNAc oraz struktury cukrowe typu hybrydowego i mannozowego. Na podstawie przeprowadzonych badań nie stwierdzono różnic w N-glikozylacji PSA pomiędzy płodnymi a z zaburzoną spermatogenezą mężczyznami. Wykazany brak korelacji pomiędzy wzorem glikozylacji PSA a glikozylacją białka całkowitego plazmy nasienia jest ważnym ustaleniem, gdyż wskazuje, że glikoepitopy PSA nie mogą pełnić roli biomarkera obniżonej płodności męskiej. Na podkreślenie zasługuje fakt, że opracowaną metodą derywatyzacji z powodzeniem można zastosować do analizy izomerii wiązaniowej kwasów sjałowych na PSA lub innych glikoproteinach wyizolowanych z innych płynów ustrojowych. Podczas lektury publikacji 3

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Katedra Fizjologii Zwierząt

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

nasunęły mi się następujące spostrzeżenia – w Suplementarny Table S-3 i S-4 do frakcji struktur wielomannozowych zaliczono strukturę z obniżoną zawartością mannozy (*ang.* paucimannose) H4N2, a w Table 2 oraz w Suplementarny Table S-3 jako przykład fukozylowanych struktur typu kompleksowego niefortunnie wybrano strukturę H3N2F1.

Z obowiązku recenzenta muszę wspomnieć o drobnych błędach literowych, stylistycznych, stosowaniu żargonów (np. „cięcie” zamiast „hydroliza” lub „proteoliza” lub „uwolnienie”) oraz skrótów myślowych (np. zamiast „...z siedmiu analizowanych glikoprotein...” powinno być „...z siedmiu analizowanych pasm/prążków glikoprotein...” oraz zamiast „...glikoproteina o masie cząsteczkowej 45 kDa.” powinno być „...prążek białkowy o masie cząsteczkowej 45 kDa.”; str. 31). Ponadto:

1. Na Rycinie 1 (str. 9) brakuje zaznaczenia miejsc proteolizy.
2. Na Rycinie 5 (str. 20) nie powinno być zaznaczonej biotynylowanej lektyny MAA, ponieważ nie używano mieszaniny tych lektyn.
3. Na Rycinie 13 B (str. 33) brakuje podstawników R.

Te drobne błędy nie mają jednak wpływu na merytoryczną stronę pracy doktorskiej.

Biorąc pod uwagę ważność tematyczną przedstawionej rozprawy doktorskiej oraz uzyskane wyniki mogę z pełną odpowiedzialnością stwierdzić, że rozprawa doktorska Pani mgr Anny Kałuży pt. *„Analiza sjałilacji N-glikomu plazmy męskiego nasienia ze szczególnym uwzględnieniem swoistego antygeny sterczowego”* spełnia warunki określone w art. 13 ust. z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595, z późn. zm.) i zwracam się z wnioskiem do Rady Dyscypliny Nauki Medycznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie Pani mgr Anny Kałuży do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Katedra Fizjologii Zwierząt

Zakład Biochemii

Glikokoniugatów

Kraków, 21 listopada 2020 r.

*Dorota Kojan-talmon*

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel.: 12 664 64 62

fax: 12 664 51 01

Lerrer et al. (2005) *Curr. Microbiol.* 51:202–206

Saraswat et al. (2016) *J. Proteome Res.* 15:991–1001

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