

**Ocena rozprawy doktorskiej
mgr Karoliny Nowickiej-Bauer
pt. *Analiza proteomu plemnikowego –
próba identyfikacji białek istotnych dla etiopatogenezy niepłodności męskiej***

Rozprawa doktorska mgr Karoliny Nowickiej-Bauer powstała w oparciu o trzy publikacje: jeden artykuł przeglądowy i dwie oryginalne prace badawcze. Wszystkie prace zostały opublikowane w czasopismach z bazy Web of Science. Wyniki badań wraz z dokumentacją dla każdej z prac oryginalnych, zostały zrecenzowane przez minimum dwóch zagranicznych ekspertów powołanych przez obie redakcje czasopism. Praca przeglądowa, opublikowana w czasopiśmie specjalistycznym o uznanej renomie, również została oceniona przez co najmniej dwóch ekspertów. Zatem moja ocena, w dużej mierze, będzie dotyczyć polskojęzycznego opracowania, w którym Doktorantka, poza włączeniem skanów trzech publikacji przygotowała omówienie w języku polskim dla każdej z nich, mające na celu uzupełnienie anglojęzycznych artykułów i zwięźczenie pracy w całość. Ponadto, w pracy znajduje się wykaz skrótów, wnioski i streszczenia w języku polskim i angielskim. Stosowne oświadczenia współautorów, załączone w końcowej części rozprawy, jednoznacznie wskazują na wiodący udział Doktorantki w opracowaniu, koncepcji, realizacji i przygotowaniu manuskryptów prac, stanowiących podstawę ubiegania się o stopień doktora nauk biologicznych. Ich dane bibliograficzne przedstawiam poniżej:

1. **Nowicka-Bauer K**, Kurpisz M. Current knowledge of the human sperm proteome. *Expert Rev Proteomics* 2013, 10: 591-605 (**IF – 3,542**).
2. **Nowicka-Bauer K**, Kamieniczna M, Cibulka J, Ulcova-Gallova Z, Kurpisz M. Proteomic identification of sperm antigens using serum samples from individuals with and without antisperm antibodies. *Andrologia* 2016, 48: 693-701 (**IF – 1,458**).
3. **Nowicka-Bauer K**, Lepczynski A, Ozgo M, Kamieniczna M, Fraczek M, Stanski L, Olszewska M, Malcher A, Skrzypczak W, Kurpisz MK. Sperm mitochondrial dysfunction and oxidative stress as possible reasons for isolated asthenozoospermia. *J Physiol Pharmacol.* 2018, 69: 403-417 (**IF – 2,478**).

O istocie problematyki, w którą Pani mgr Karolina Nowicka-Bauer została włączona, niech świadczy pierwsze zdanie rozprawy. „*Niepłodność jest nie tylko problemem klinicznym, ale przede wszystkim społecznym*”.

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Zakład Endokrynologii

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel./fax: +48 12 664 50 9

Doktorantka we Wstępie opiera się na danych Światowej Organizacji Zdrowia, zwięźle omawia rodzaje patologii nasienia, typy niepłodności męskiej i jej czynniki, do których zalicza zaburzenia funkcji układu endokrynnego, wady anatomiczne męskiego układu moczowo-płciowego i jego bakteryjne i wirusowe zakażenia, wpływ środowiska oraz zaburzenia o podłożu genetycznym i immunologicznym. Wg Autorki, pomimo znacznego postępu badań z zakresu genetyki molekularnej, niepłodność na tle immunologicznym cechuje brak odpowiednich metod analitycznych dla ustalenia jej przyczyn i prowadzenia skutecznego leczenia.

Dlatego podjęcie badań, które miały na celu ustalenie molekularnych przyczyn występowania niepłodności męskiej przy zastosowaniu technik proteomowych oceniam bardzo wysoko.

Doktorantka określała białka plemnika zaangażowane w dwa typy niepłodności, tj. niepłodność na tle immunologicznym oraz izolowaną asthenozoospermie. Identyfikowała antygeny plemnika rozpoznawane przez przeciwciała przeciwplemnikowe (ASA) z surowicy niepłodnych kobiet i mężczyzn oraz te, występujące w surowicy ASA-negatywnych osób płodnych, co traktowała jako kontrolę. Ponadto, u mężczyzn z izolowaną asthenozoospermie identyfikowała białka plemnika o zmienionej ekspresji i badała związek pomiędzy osłabionym ruchem plemników, funkcją mitochondriów i obecnością stresu oksydacyjnego. Co istotne, dokonała tego po uprzednim zebraniu i przeanalizowaniu danych literaturowych i zapoznaniu się z technikami proteomowymi stosowanymi w badaniach męskiej niepłodności. Pragnę szczególnie podkreślić wagę włączenia artykułu przeglądowego w ocenianą rozprawę. Doktorantka zgłębiła literaturę przedmiotu, co zaowocowało zawartymi w pracy tabelami, przedstawieniem metodologii i prawidłowym wspieraniem własnego wnioskowania światowym piśmiennictwem. Jestem przekonana, że w ten sposób przystąpiła w pełni przygotowana do pracy laboratoryjnej i późniejszej interpretacji uzyskanych wyników. Świadczą o tym również czytelne ryciny w polskojęzycznym opracowaniu, których zamieszczenie jest w pełni poparte tekstem. W poznaniu przyczyn niepłodności męskiej Pani mgr Nowicka-Bauer podkreśla istotę badań proteomowych, choć pokazuje także przydatność zastosowania innych technik biologii molekularnej do identyfikacji przyczyn męskiej niepłodności, co znalazło odzwierciedlenie w bardzo prostej, informatywnej rycinie 4, a także w kolejnych rycinach, pokazujących graficzne ujęcie dwóch podejść badawczych stosowanych w proteomice (ryc.5) oraz etapy analizy proteomowej plemnika lub plazmy nasienia (ryc. 6).

W swoich badaniach mgr Karolina Nowicka-Bauer dokonała identyfikacji białek plemnika, co pozwoliło na ich klasyfikację w trzech grupach antygenów: Pierwsza grupa, to 32 antygeny rozpoznawane specyficznie przez ASA-pozytywne surowice, w drugiej grupie 35 antygenów rozpoznawanych przez ASA-pozytywne i ASA-negatywne surowice, oraz trzecia grupa stanowiąca

13 antygenów rozpoznawanych wyłącznie przez ASA-negatywne, kontrolne surowice. Wśród antygenów pierwszej grupy, 12 białek było znanych jako zaangażowanych w proces zapłodnienia, co pozwoliło na identyfikację trzech białek rozpoznanych wyłącznie przez przeciwciała zawarte w surowicy niepłodnych kobiet, z czego dwa, to białka związane z interakcją plemnika z osłonką przejrzystą oocytu, a trzecie, to białko plemnikowo swoiste, o słabo poznanej roli w zapłodnieniu. W badaniach przyczyn izolowanej asthenozoospermii Doktorantka wykazała 25 białek o zmienionej ekspresji i związanych ze szlakami metabolicznymi odpowiedzialnymi za zasoby energetyczne plemnika. Należy podkreślić, że prowadzenie dalszych badań, tj. zmian potencjału mitochondrialnego plemnika i poziomu reaktywnych form tlenu pochodzenia mitochondrialnego Doktorantka bardzo poprawnie uzasadnia i dyskutuje uzyskane wyniki w świetle oryginalnych badań światowych.

Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka wyciągnęła dobrze sformułowane wnioski. Uznała bowiem, że niepłodność na tle immunologicznym może mieć przyczynę w reakcji przeciwciał przeciwplemnikowych z białkami plemnika zaangażowanymi bezpośrednio w proces zapłodnienia. Co więcej, stwierdziła, że przeciwciała przeciwplemnikowe produkowane przez niepłodne kobiety mogą być skierowane przeciwko specyficznym białkom plemnikowym. Dalsze wnioski doprowadziły mgr Nowicką-Bauer do stwierdzenia, iż izolowana asthenozoospermia może być związana z dysfunkcją mitochondriów w plemniku, i co za tym idzie, zaburzeniem produkcji energii i obecnością stresu oksydacyjnego. W świetle badań światowych dotyczących wpływu różnych czynników na proces dojrzewania plemników powstałych w wyniku spermatogenezy w gonadzie, bardzo interesujący jest wniosek o najądrzach jako potencjalnym miejscem podwyższonego stresu oksydacyjnego, w których plemniki dojrzewając, nabywają cech funkcjonalnych i są magazynowane aż do czasu ich uwolnienia podczas ejakulacji.

Z prawdziwym uznaniem stwierdzam, że przygotowanie rozprawy doktorskiej, której podstawą są publikacje została wzorcowo opracowana. Nie ma bowiem zbędnych powtórzeń metodycznych, które zostały przedstawione w publikacjach, natomiast zarówno bardzo dobrze napisany wstęp jak i zwięzłe polskojęzyczne omówienie każdej z prac eksperymentalnych oraz wnioski nadają pracy wspólny charakter i pokazują poważny cel pracy jakim są badania prowadzące do identyfikacji antygenów ludzkiego plemnika, reagujących z przeciwciałami obecnymi w surowicy niepłodnych mężczyzn i kobiet.

Jednym z elementów oceny jest zwrócenie uwagi recenzenta na braki, błędy czy nieścisłości. Przyznaję, że rozprawę Pani mgr Nowickiej-Bauer cechuje wyjątkowa staranność w przygotowanie

całości i jej edytorska poprawność. Zarówno pod względem merytorycznym jak i metodologicznym nie znajduję uchybień. Doktorantka, co należy do rzadkości, ustrzegła się całkowicie wyrażen żargonowych, a ryciny są bardzo starannie przygotowane i opisane, co sprawia, że (po raz pierwszy) nie mam uwag krytycznych.

Podsumowując, bardzo pozytywnie oceniam przedłożoną do recenzji dysertację i stwierdzam, że Pani mgr Nowicka-Bauer w pełni zasługuje na nadanie stopnia doktora. Doktorantka jednoznacznie wykazała przygotowanie i umiejętność pracy nowoczesnymi technikami, prawidłowo je wykorzystywała, i co więcej, w przeglądowej publikacji pokazała bardzo dobrą znajomość zagadnienia. Ujęcie problemu w oryginalnych pracach badawczych pokazuje logiczne dążenie do rozwiązania postawionego celu, co niewątpliwie jest zasługą przygotowania Doktorantki przez Promotora, prof. dr hab. Macieja Kurpisza, uznanego w świecie autorytetu, którego wiedza i doświadczenie naukowe z zakresu badań niepłodności męskiej na tle immunologicznym jest powszechnie znane i cenione.

Całość rozprawy pokazuje dużą wiedzę Doktorantki i umiejętność dyskusji wyników własnych. Pragnę zaznaczyć, iż Pani mgr Nowicka-Bauer, umiejętnie włączyła się w nurt aktualnej i bardzo ważnej klinicznie problematyki, pracując nowoczesnymi technikami biologii molekularnej stosowanymi w biomedycznych badaniach podstawowych. Atutem niniejszej rozprawy jest szeroko zakrojona problematyka i wartość poznawcza badań, które przyczyniają się do rozpoznania etiologii dwóch typów niepłodności męskiej.

Wniosek końcowy

W świetle powyższych danych stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Karoliny Nowickiej-Bauer spełnia wszystkie kryteria stawiane pracom doktorskim w myśl artykułu 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym, oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 poz. 1789) i wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr Karoliny Nowickiej-Bauer do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na walory poznawcze badań, których wyniki zostały opublikowane w czasopiśmie indeksowanym w bazie Web of Science, wnioskuję o jej wyróżnienie w formie przewidzianej regulaminem Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu.



Kraków, 20 grudnia 2018 r.