

Prof. dr hab. n. med. Piotr Jędrzejczak

Poznań, 28 grudnia 2018.

Klinika Niepłodności i Endokrynologii Rozrodu

Uniwersytetu Medycznego

im. Karola Marcinkowskiego

ul. Polna 33, Poznań

**Pan Profesor dr hab. n. med. Ryszard Słomski**

**Przewodniczący Komisji Doktorskiej**

**Instytut Genetyki Człowieka PAN**

**ul. Strzeszyńska 32,**

**60-479 Poznań**

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Nowickiej-Bauer

„Analiza proteomu plemnikowego-próba identyfikacji białek istotnych dla etiopatogenezy niepłodności męskiej”

Niepłodność partnerska, to jedna z najczęstszych współcześnie chorób, gdyż dotyczy co siódmej pary w wieku rozrodczym. W około sześćdziesięciu procentach par nieprawidłowości po stronie partnera męskiego stanowią jedyne zaburzenie lub współistnieją ze stanem chorobowym po stronie kobiety. Istnieje coraz więcej danych wskazujących na zwiększający się odsetek niepłodnych mężczyzn. Sprzyja temu między innymi: narastający stres, zakłócenia środowiska naturalnego, siedzący tryb życia, czy nieprawidłowe odżywianie.

W diagnostyce męskiej niepłodności w ostatnich latach zainteresowanie budzi systemowa ocena patofizjologii białek plemnika mających podstawowe znaczenie dla zapłodnienia komórki jajowej. Nieprawidłowości struktury lub funkcji tych białek niechybnie pociągają za sobą wystąpienie niepłodności po stronie męczyzny. Poznanie wspomnianych mechanizmów molekularnych może z kolei przyczynić się do poprawy męskich zdolności rozrodczych. Z drugiej strony dokładna analiza substancji białkowych istotnych dla zapłodnienia może pomóc w opracowaniu skutecznej szczepionki antykoncepcyjnej dla męczyzn. Stąd podjęcie tematu dotyczącego próby identyfikacji białek znaczących dla etiopatogenezy niepłodności męskiej przez panią mgr Karolinę Nowicką-Bauer uważam za zadanie bardzo aktualne i niezwykle ważne z punktu widzenia medycyny rozrodu.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska obejmuje wstęp, cel pracy, cykl trzech publikacji stanowiących trzon rozprawy, wnioski oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. Na zakończenie autorka zamieszcza zgody współautorów na wykorzystanie tych trzech publikacji w prezentowanym przewodzie doktorskim.

We wstępie doktorantka omawia epidemiologię niepłodności koncentrując się na czynniku męskim. Wymienia kolejno znane przyczyny zaburzeń męskiego rozrodu, takie jak: wynikające z nieprawidłowości endokrynnych, czy wad anatomicznych, które spotyka się coraz częściej. W kolejnej części wstępu poruszany jest ważny temat zakażeń bakteryjnych i wirusowych układu moczowo-płciowego i ich wpływu na ograniczenie męskiego rozrodu. Sporo miejsca poświęca przyczynom immunologicznym. Doktorantka nie mogła pominąć także podłoża genetycznego niepłodności męskiej, które występuje u 15% pacjentów. Jest to szczególnie ważne zagadnienie z uwagi chociażby na zwiększenie ilości par poddanych metodom wspomaganej prokreacji. Poruszany jest również aspekt negatywnego wpływu środowiska na męski rozród. Mgr Karolina Nowicka-Bauer słusznie zauważa, że pomimo znacznego postępu badań, aż w połowie przypadków niepłodności męskiej etiologia nie jest jeszcze poznana.

We wstępie doktorantka uwypukla również negatywny wpływ stresu oksydacyjnego na męski potencjał rozrodczy. W warunkach patologicznych może on powodować fragmentację plemnikowego DNA, RNA, a w konsekwencji poza obniżeniem zdolności zapładniającej nasienia także do nieprawidłowego rozwoju powstałego zarodka. W pełni zgadzam się z autorką, że wysoki odsetek przypadków niepłodności idiopatycznej narzuca konieczność dalszych badań. Szczególnie duży potencjał w poznaniu przyczyn niepłodności mają techniki biologii molekularnej, w tym badania proteomowe, polegające na określeniu poziomu ekspresji białek plemnika w stanie fizjologicznym i patologicznym. Technika oparta o spektrometrię mas



umożliwia dokonanie identyfikacji poszczególnych, istotnych z punktu widzenia rozrodu białek. Pozwala także na określenie funkcji molekularnych zidentyfikowanych białek, poznanie ich udziału w procesach biologicznych, czy ich lokalizację w obrębie komórki. W dalszym etapie możliwe jest określenie istniejących szlaków metabolicznych. Wszystko to zdaniem doktorantki, z czym się w pełni zgadzam, pozwala lepiej poznać proces zapłodnienia komórki jajowej i w rezultacie przyczynić się przybliżenia molekularnego podłoża męskiej niepłodności. Proteomika porównawcza umożliwia wytypowanie nieprawidłowych szlaków metabolicznych oraz innych procesów istotnych z punktu widzenia zaburzeń męskiego rozrodu. Doktorantka słusznie zauważa, że w ocenie molekularnych przyczyn ograniczenia męskiej płodności nie można pominąć badania składu białek płynu nasiennego, które stanowią środowisko dla gamet męskich.

Cel badań nakreślony w rozprawie jest jasny i czytelny.

W prezentowanej rozprawie doktorskiej zamieszczone zostały 3 publikacje naukowe, dotyczące niepłodności męskiej w kontekście zmian dotyczących proteomu plemników. Pani mgr Karolina Nowicka-Bauer jest pierwszą autorką wszystkich tych trzech opracowań. Sumaryczny *impact factor* tych prac wynosi 7,5.

Pierwsza publikacja: „*Current knowledge on the human sperm proteome*”, jest pracą przeglądową dokonującą analiz metodyki technik proteomowych istotnych z punktu widzenia rozrodu męskiego. W doniesieniu tym omówiono techniki izolacji białek gamety męskiej, ich rozdział oraz identyfikację. Autorzy, w oparciu o bieżącą literaturę naukową zawarli informacje dotyczące aktualnych badań nad proteomem ludzkich plemników pochodzących od osobników zdrowych. Ponadto przedstawiono dwie autorskie tabele obejmujące wiedzę na temat aktualnych danych nad proteomem plemnika w aspekcie męskiej niepłodności: typu lizatu, użytych technik proteomowych i rodzaju zidentyfikowanych białek. W trzeciej tabeli przedstawiono zestaw białek gamety męskiej w odniesieniu do sugerowanej patologii wraz oznaczeniem poziomu ich ekspresji. Osobny fragment dotyczy wyników analizy plazmy nasiennej. Istotny temat podjęty w tej publikacji to identyfikacja zaburzeń ekspresji białek u par z niepowodzeniami zapłodnienia pozaustrojowego. Dalsze badania proteomowe z pewnością przyczynią się do poznania biomarkerów odpowiedzialnych za zaburzenie poszczególnych etapów zapłodnienia. Z kolei poznanie antygenów plemnikowych, na co zwracają uwagę autorzy, będzie szczególnie cenne w opracowaniu skutecznej, celowanej szczepionki antykoncepcyjnej dla mężczyzn.

Praca opublikowana została w czasopiśmie *Expert Rev Proteomics* w roku 2013.

Kolejnym etapem dysertacji było określenie białek zaangażowanych w niepłodność na tle immunologicznym. Służyła temu druga publikacja *"Proteomic identification of sperm antigens using serum samples from individuals with and without antisperm antigens"*, w której mgr Karolina Nowicka-Bauer jest także pierwszym autorem. Na uwagę zasługuje mnogość technik badawczych służących do realizacji podjętego zadania. Plemniki od osobników zdrowych selekcjonowano przy pomocy metody *swim-up*, które poddane zostały następnie lizie w celu otrzymania lizatów białkowych, gdzie analizowano immunoreaktywne antygeny. Weryfikacji surowic pod względem obecności przeciwciał wykonano za pośrednictwem pośredniego testu wiązania paciorków poliakryloamidowych, lub płytkowego testu aglutynacyjnego. Rozdział białkowych ekstraktów następował za pomocą elektroforezy 2-D, po czym podawano je immunoblotowaniu typu Western z próbkami surowic od niepłodnych par. Kontrole negatywne zawierały surowice bez przeciwciał przeciwpłennikowych. Następnie plamki białkowe poddane zostały analizie chromatograficznej. Autorzy zidentyfikowali aż 80 różnych antygenów gamet męskich, klasyfikując je do trzech rodzajów: antygeny rozpoznawane specyficznie przez surowice zawierające antygeny plemnikowe (ASA), antygeny rozpoznawane przez surowice ASA-pozytywne, jak i ASA-negatywne oraz trzecia grupa: antygeny rozpoznawane wyłącznie przez surowice kontrolne ASA-negatywne. Na podstawie uzyskanych wyników autorzy wyizolowali 3 antygeny, które mogą być rozpoznane jedynie przez przeciwciała obecne w surowicy pacjentek niepłodnych. Funkcja dwóch z nich dotyczy interakcji plemnika z osłonką przejrzystą komórki jajowej, natomiast trzecie jest białkiem specyficznym dla gamety męskiej. Są to wyniki oryginalne i bardzo wartościowe. W dyskusji autorzy dochodzą do wniosku, że obecne w surowicy przeciwciała osób płodnych oraz mających problemy z płodnością są w stanie reagować z wieloma białkami plemników. Ważnym stwierdzeniem, w oparciu o uzyskane wyniki jest teza, że w niektórych sytuacjach, jak na przykład podczas zachodzących reakcji krzyżowych może dojść do utraty tolerancji wobec poszczególnych elementów strukturalnych plemników. Przyczyną powstawania ASA w surowicy kobiet może być zjawisko mimikry molekularnej występującej w wyniku infekcji niektórymi drobnoustrojami, a białkami plemników. W rezultacie może nastąpić brak zapłodnienia lub utrata ciąży na wczesnym jej etapie.

Publikację tę opublikowano w czasopiśmie *Andrologia* w roku 2016.

W trzeciej publikacji zawartej w dysertacji doktorskiej, mgr Karolina Nowicka-Bauer wraz z zespołem oceniała molekularne podłoże izolowanego zaburzenia ruchliwości plemników-



asthenozoospermii. W pracy „*Sperm mitochondrial dysfunction and oxidative stress as possible reasons for isolated asthenozoospermia*” autorzy zainteresowali się przypadkiem izolowanej asthenozoospermii, gdzie na podstawie dotychczasowych badań nie można ustalić tła zaburzenia ruchliwości plemników, a jedyną szansą dla tych mężczyzn na posiadanie potomstwa są metody wspomaganej prokreacji. W badaniach tych w plemnikach z grupy badanej oraz od mężczyzn z prawidłowym ruchem gamet, po izolacji i rozdzieleniu elektroforetycznym oceniano mapy białkowe pod kątem zmienionej ekspresji. Dokonywano również oceny statusu mitochondriów plemników i poziom produkowanych reaktywnych form tlenu. Autorom udało się zidentyfikować aż 25 białek o zmienionej ekspresji u osobników z asthenozoospermia. W większości były to białka pochodzące z mitochondriów, co nie powinno dziwić, gdyż te struktury są odpowiedzialne za produkcję energii niezbędną do aktywacji ruchu plemników. Potencjał mitochondrialny tych gamet był zdecydowanie niższy, a produkcja wolnych rodników wyższa, co potwierdza zaburzenie funkcji tych organelli komórkowych przy nieprawidłowej ekspresji badanych białek. W dalszym etapie wyselekcjonowano trzy białka (LTF, ELSPBP1 oraz DJ1) kluczowe w szlakach metabolicznych warunkujących prawidłową kinematykę plemników, czy proces kapacytacji. Oprócz ważnych dla biologii komórki wartości poznawczych, uzyskane rezultaty mogą dać punkt wyjścia do dalszych prac i zastosowania uzyskanych wyników w diagnostyce, czy terapii zaburzeń męskiego rozrodu.

Wyniki tych badań, gdzie pani mgr Karolina Nowicka-Bauer była ponownie pierwszym autorem opublikowane zostały w czasopiśmie *J Physiol Pharmacol* w 2018 roku.

Podsumowując, przedstawiona do oceny rozprawa składa się na logiczną monotematyczną całość, zastosowana metodyka jest bardzo wartościowa, charakter badań jest z pewnością nowatorski i otrzymane wyniki zasługują na uznanie. Wyciągnięte wnioski odpowiadają postawionym celom pracy. To, co moim zdaniem jest najbardziej ciekawe w ciągu przedstawionych prac, to potencjalne możliwości zastosowania rezultatów badań w postępowaniu diagnostyczno- terapeutycznym, w przypadkach niepłodności męskiej uznanej do tej pory za nieznanego pochodzenia i stwarzające duże trudności lekarzom.

Na podstawie dokonanej recenzji rozprawy doktorskiej „Analiza proteomu plemnikowego- próba identyfikacji białek istotnych dla etiopatogenezy niepłodności męskiej” z pełnym przekonaniem rekomenduję Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu dopuszczenie mgr Karoliny Nowickiej-Bauer do dalszych etapów przewodu

doktorskiego. Ponadto stwierdzam, że spełnia ona kryteria określone w art. 16 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym.

Zważywszy na wysoki walor poznawczy prezentowanej pracy wnoszę jednocześnie o jej wyróżnienie.

Prof. dr n. med. Piotr Jędrzejczak

Piotr Jędrzejczak  
1335835  
Prof. dr hab. n. med. Piotr Jędrzejczak  
Specjalista  
W PEDIATRII I ONKOLOGII  
tel. 601 820 412