

Spis treści

I. IMIONA I NAZWISKO	2
II. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE/ARTYSTYCZNE – Z PODANIEM NAZWY, MIEJSCA I ROKU ICH UZYSKANIA ORAZ TYTUŁU ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	2
III. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH/ARTYSTYCZNYCH	2
IV. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA WYNIKAJĄCEGO Z ART. 16 UST. 2 USTAWY Z DNIA 14 MARCA 2003 R. O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM ORAZ O STOPNIACH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI (DZ. U. Z 2003 R. NR 65, POZ. 595 ZE ZM.).....	3
A. <i>Tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego</i>	3
B. <i>Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe, o którym mowa w art. 16 ust. 2 ustawy (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa).....</i>	3
C. <i>Omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/pracach i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.....</i>	5
D. <i>Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.....</i>	19
V. DOROBEK DYDAKTYCZNY I POPULARYZATORSKI ORAZ INFORMACJA O WSPÓŁPRACY KRAJOWEJ I MIĘDZYNARODOWEJ.....	28
a. <i>Uczestnictwo w programach europejskich oraz innych programach międzynarodowych i krajowych.....</i>	28
b. <i>Udział w międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych.....</i>	29
c. <i>Członkostwo w międzynarodowych i krajowych organizacjach oraz towarzystwach naukowych</i>	31
d. <i>Osiągnięcia dydaktyczne i w zakresie popularyzacji nauki lub sztuki.....</i>	31
e. <i>Opieka naukowa nad studentami i doktorantami w charakterze opiekuna naukowego lub promotora pomocniczego.....</i>	33
f. <i>Współpraca naukowa z instytucjami, organizacjami i towarzystwami naukowymi w kraju i za granicą.....</i>	34
g. <i>Recenzowanie manuskryptów publikacji w czasopismach międzynarodowych lub krajowych.....</i>	35
h. <i>Kierowanie międzynarodowymi lub krajowymi projektami badawczymi oraz udział w takich projektach.....</i>	35
i. <i>Międzynarodowe i krajowe nagrody za działalność naukową albo artystyczną.....</i>	36
j. <i>Główny obszar zainteresowań.....</i>	36

AUTOREFERAT

I. IMIONA I NAZWISKO:

Ewa Maria Kratz

II. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE/ARTYSTYCZNE – Z PODANIEM NAZWY, MIEJSCA I ROKU ICH UZYSKANIA ORAZ TYTUŁU ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

- 2003 - stopień doktora nauk medycznych, specjalność: biologia medyczna; Akademia Medyczna im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, Wydział Lekarski, Katedra i Zakład Chemii i Immunochemii. Tytuł rozprawy: „**Glikozylacja α_1 -kwaśnej glikoproteiny występującej w plazmie nasienia ludzkiego**”;
- 1996 - dyplom magistra analityki medycznej; Akademia Medyczna im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, Wydział Farmaceutyczny, Oddział Analityki Medycznej, Katedra i Zakład Analityki Medycznej. Tytuł pracy: „**Aktywność ACE u kobiet w III trymestrze ciąży powikłanej EPH-gestożą**”;
- 1990 - dyplom technika analityki medycznej; Medyczne Studium Zawodowe, Wydział Techników Analityki Medycznej w Rzeszowie.

III. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH/ARTYSTYCZNYCH

- od 2012 praca naukowo-badawcza i dydaktyczna na stanowisku adiunkta w Katedrze i Zakładzie Chemii i Immunochemii, Wydział Lekarski, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu;
- 2004-2012 praca naukowo-badawcza i dydaktyczna na stanowisku adiunkta w Katedrze i Zakładzie Chemii i Immunochemii, Wydział Lekarski, Akademia Medyczna im. Piastów Śląskich we Wrocławiu;
- 1997-2004 praca naukowo-badawcza i dydaktyczna na stanowisku asystenta w Katedrze i Zakładzie Chemii i Immunochemii, Wydział Lekarski, Akademia Medyczna im. Piastów Śląskich we Wrocławiu;
- 1996-1997 praca naukowo-badawcza i dydaktyczna na stanowisku asystenta w Katedrze i Zakładzie Chemii Ogólnej, Wydział Lekarski, Akademia Medyczna im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.

Staż i stypendia naukowe:

- 2013** – staż naukowy (3 tygodnie; 09.06.-30.06.2013) w Department of Pathophysiology and Allergy Research at the Center of Pathophysiology, Infectiology and Immunology, group of Cellular Pathology and Pharmacokinetics, Medical University in Vienna, Austria;
- 2011** – podoktorskie stypendium naukowe (10 miesięcy; 01.03.-31.12.2011) w ramach projektu pn. “Program rozwoju Akademii Medycznej we Wrocławiu,” realizowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego, Program Operacyjny Kapitał Ludzki (Umowa nr UDA-POKL.04.01.01-00-010/08-01);

- 2002** – Grant European Commission Research DG (Human Potential Programme) dla młodych naukowców, 6-th Jenner Glycobiology and Medicine Symposium, Seillac, Francja (14.09-17.09.2002);
- 2001** – staż naukowy (2 tygodnie; 19.08.-30.08.2001) w Department of Molecular Cell Biology, Glycoimmunology Group, Vrije Universiteit Medical Center, Amsterdam, Holandia; stypendium Fundacji im. Emila Niedźwirskiego;
- 2001** – staż naukowy (3 miesiące; 15.02.-15.05.2001), stypendium w ramach programu SOCRATES-ERASMUS, Department of Molecular Cell Biology, Glycoimmunology Group, Vrije Universiteit Medical Center, Amsterdam, Holandia.

IV. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA WYNIKAJĄCEGO Z ART. 16 UST. 2 USTAWY Z DNIA 14 MARCA 2003 R. O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM ORAZ O STOPNIACH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI (Dz. U. z 2003 R. NR 65, POZ. 595 ZE ZM.)

A. Tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego:

Zgodnie z treścią w/w ustawy, osiągnięciem naukowym, dołączonym do wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego, jest cykl sześciu prac powiązanych tematycznie, objętych wspólnym tytułem:

„Analiza markerów biochemicznych plazmy nasienia ludzkiego w kontekście diagnostyki męskiej niepłodności”

B. Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe, o którym mowa w art. 16 ust. 2 ustawy (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa):

1. **Kratz EM**, Faundez R, Kątnik-Prastowska I. Fucose and sialic acid expressions in human seminal fibronectin and α 1-acid glycoprotein associated with leukocytospermia of infertile men. 2011,31(5):317-325, Dis. Markers.
IF: 1.642, Pkt. MNiSW/KBN: 32.000

Autor do korespondencji; zaprojektowanie badań; koordynacja i wykonanie zaplanowanych doświadczeń; wiodący udział w analizie (w tym analiza statystyczna) i interpretacji otrzymanych wyników oraz w pisaniu i przygotowaniu manuskryptu do druku.
Mój indywidualny wkład w autorstwo szacuję na 75%.

2. **Kratz EM**, Ferens-Sieczkowska M, Faundez R, Kątnik-Prastowska I. Changes in fucosylation of human seminal IgG and secretory component of IgA in leukocytospermic patients. 2014 Jan;31(1):51-60, Glycoconj. J.
IF: 1.948₂₀₁₃, Pkt. MNiSW/KBN: 20.000

Autor do korespondencji; zaprojektowanie badań; koordynacja i wykonanie zaplanowanych doświadczeń; wiodący udział w analizie (w tym analiza statystyczna) i interpretacji otrzymanych wyników oraz w pisaniu i przygotowaniu manuskryptu do druku.
Mój indywidualny wkład w autorstwo szacuję na 75%.

3. **Kratz EM**, Ferens-Sieczkowska M. Association of IgA secretory component sialylation with leucocytospermia of infertile men - a pilot study. 2014 Dec;46(10):1200-1202, *Andrologia*.

IF: 1.172₂₀₁₃, Pkt. MNiSW/KBN: 20.000

Autor do korespondencji; pomysłodawca tematu, zaprojektowanie badań; koordynacja i wykonanie zaplanowanych doświadczeń; wiodący udział w analizie i interpretacji otrzymanych wyników oraz w pisaniu i przygotowaniu manuskryptu do druku.

Mój indywidualny wkład w autorstwo szacuję na 80%.

4. **Kratz EM**, Kałuża A, Zimmer M, Ferens-Sieczkowska M. The analysis of sialylation, *N*-glycan branching and expression of *O*-glycans in seminal plasma of infertile men. 2015;2015:941871, *Dis. Markers*. doi: 10.1155/2015/941871. Epub 2015 Mar 29.

IF: 2.174₂₀₁₃, Pkt. MNiSW/KBN: 25.000

Autor do korespondencji; koordynacja pracy eksperymentalnej; charakterystyka i wyodrębnienie grup badanych na podstawie wyników standardowego badania nasienia; wiodący udział w analizie (w tym analiza statystyczna) i interpretacji wyników oraz w pisaniu i przygotowaniu manuskryptu do druku.

Mój indywidualny wkład w autorstwo szacuję na 70%.

5. **Kratz EM**, Kałuża A, Ferens-Sieczkowska M, Olejnik B, Fiutek R, Zimmer M, Piwowar A. Gelatinases and their tissue inhibitors are associated with oxidative stress: a potential set of markers connected with male infertility. 2015 Jan 7, *Reprod. Fertil. Dev.* doi: 10.1071/RD14268. [Epub ahead of print]

IF: 2.577₂₀₁₃, Pkt. MNiSW/KBN: 25.000

Autor do korespondencji; pomysłodawca tematu, zaprojektowanie badań; koordynacja części eksperymentalnej; charakterystyka i wyodrębnienie grup badanych na podstawie wyników standardowego badania nasienia; oznaczenie stężeń MMP-9 i TIMP; wiodący udział w analizie (w tym analiza statystyczna) i interpretacji otrzymanych wyników oraz w pisaniu i przygotowaniu manuskryptu do druku.

Mój indywidualny wkład w autorstwo szacuję na 70%.

6. **Kratz EM**, Piwowar A, Zeman M, Stebelová K, Thalhammer T. Decreased melatonin levels and increased levels of advanced oxidation protein products in the seminal plasma are related to male infertility. 2014 Sep 12, *Reprod. Fertil. Dev.* doi: 10.1071/RD14165. [Epub ahead of print]

IF: 2.577₂₀₁₃, Pkt. MNiSW/KBN: 25.000

Autor do korespondencji; pomysłodawca tematu, zaprojektowanie i nadzorowanie badań; charakterystyka i wyodrębnienie grup badanych na podstawie wyników standardowego badania nasienia; bieżąca analiza otrzymywanych wyników; wiodący udział w analizie (w tym analiza statystyczna) i interpretacji wyników oraz w pisaniu i przygotowaniu manuskryptu do druku.

Mój indywidualny wkład w autorstwo szacuję na 65%.

Sumaryczny IF: 12.09

Punkty MNiSW/KBN: 147

C. Omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/pracach i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania:

Po ukończeniu studiów na Wydziale Farmaceutycznym (Oddział Analityki Medycznej) Akademii Medycznej im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, po konkursie, rozpoczęłam pracę jako asystent w Katedrze i Zakładzie Chemii Ogólnej (od roku 1997: Katedra i Zakład Chemii i Immunochemii) Wydziału Lekarskiego Akademii Medycznej we Wrocławiu (od 2012 r. Uniwersytet Medyczny). Niemal od początku pracy moje zainteresowania naukowe były związane z poszukiwaniem i analizą markerów biochemicznych obecnych w ludzkiej plazmie nasienia, których dokładniejsze poznanie przyczyniłoby się do poszerzenia panelu parametrów wykorzystywanych w diagnostyce męskiej niepłodności/upośledzonej płodności, z uwzględnieniem tej o niewyjaśnionej etiologii, tzw. niepłodności idiopatycznej.

Wprowadzenie

Obecnie około 15% par w okresie rozrodczym ma problem ze spółdzeniem potomstwa, a często identyfikowaną przyczynę stanowi czynnik męski, sięgając 60%. Spośród tej części mężczyzn, 3 - 5% to osobnicy niepłodni, których nasienie nie zawiera plemników. Pozostałą część stanowią mężczyźni o nie udowodnionym ojcostwie, ze zmniejszonym potencjałem rozrodczym, na co wskazują obniżone wartości parametrów nasienia. Analizując raporty Światowej Organizacji Zdrowia (ang. World Health Organization, WHO) łatwo zauważyć, że problem męskiej niepłodności pogłębił się w przeciągu ostatnich lat i dotyczy szczególnie cywilizacji wysoko rozwiniętych. Oprócz oczywistego skutku w postaci braku potomstwa, niepłodność ma także konsekwencje psychologiczne, wpływające bezpośrednio na jakość życia mężczyzny [omówiono w Kowalczyk i Kratz, 2011]. Podstawowym wskaźnikiem w procesie diagnostycznym niepłodności pary oraz ocenie czynnika męskiego, zgodnie z zaleceniami WHO, jest standardowe badanie nasienia, opisujące liczbę, ruchliwość i budowę plemników [WHO 2010]. Wartości rekomendowane przez WHO dla standardowej oceny nasienia, mają znaczenie w prognozowaniu płodności dużych populacji, jednakże nie są wystarczające aby w pełni określić zdolność nasienia konkretnego dawcy do zapłodnienia komórki jajowej. Problemem staje się możliwość przewidywania zdolności plemników do zapłodnienia w przypadkach niewyjaśnionej niepłodności przy prawidłowym obrazie nasienia [Purvis i wsp., 1992; Kuczyński i wsp., 1997]. Około 85% mężczyzn z prawidłowymi wartościami parametrów nasienia zapładnia zdrowe partnerki w czasie 12 miesięcy współżycia. Miesięczne prawdopodobieństwo ciąży, które wśród zdrowych par wynosi około 25%, w przypadkach z towarzyszącymi zaburzeniami męskiej płodności nie przekracza 1,5% i w miarę upływu czasu trwania niepłodności gwałtownie się zmniejsza [Kuczyński i wsp., 1997].

Dlatego też aby określić status płodności indywidualnego pacjenta istnieje konieczność stosowania dodatkowych testów i metod diagnostycznych oraz identyfikacji czynników wpływających pozytywnie lub negatywnie na potencjał rozrodczy pary starającej się o potomstwo [Kim i Lipshultz, 1997; Kuczyński i wsp., 1997]. O niepłodności idiopatycznej mówimy w przypadku, gdy standardowe badania nie wyjaśniają przyczyny niemożności poczęcia dziecka. Kryterium rozpoznania niepłodności niewyjaśnionej pochodzenia jest co najmniej 2-letni okres niezachodzenia partnerki w ciążę, mimo regularnych stosunków i braku obciążających danych w wywiadzie, np. o przeżytym poronieniu, czy stanie zapalnym w obrębie dróg rodnych kobiety [Kuczyński i wsp., 1997].

Poszukiwanie nowych markerów diagnostycznych niepłodności męskiej wykracza poza cechy fizjologiczne plemników, takie jak ich budowa, liczba czy ruchliwość. Na stan fizjologiczny oraz zdolność plemników do zapłodnienia mogą wpływać także mało dotychczas zbadane parametry biochemiczne plazmy nasienia zawierającej wydzieliny m.in. komórek jąder, kanalików nasiennych oraz prostaty. Od początku działalności naukowej moja uwaga skupiała się na określeniu stopnia ekspresji i analizie profilu oraz stopnia glikozylacji glikoprotein plazmy nasienia, potencjalnie odgrywających rolę pośrednią lub bezpośrednią w przebiegu procesu zapłodnienia, takich jak α_1 -kwaśna glikoproteina (AGP), fibronektyna (FN) i wydzielnicza immunoglobulina A [Poland i wsp., 2002; Kratz i wsp., 2003; Kratz i wsp., 2004; Kątnik-Prastowska i wsp., 2006]. W swoich wcześniejszych badaniach najwięcej uwagi poświęciłam analizie profilu i stopnia glikozylacji (sjalilacji i fukozytacji) białka ostrej fazy α_1 -kwaśnej glikoproteiny (AGP), a uzyskane wyniki badań zostały zawarte w mojej rozprawie doktorskiej, przedstawione w kilku pracach oryginalnych opublikowanych w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym, w postaci doniesień konferencyjnych, a także stanowiły podstawę do przygotowania prac poglądowych. Równocześnie zajęłam się badaniami dotyczącymi glikozylacji fibronektyny, jednej z glikoprotein obecnych w ludzkiej plazmie nasienia, biorącej udział m.in. w procesach związanych z żelifikacją i upłynnieniem nasienia, czy z oddziaływaniami plemnik - osłonka przejrzysta komórki jajowej, mających wpływ na prawidłowy przebieg procesu zapłodnienia. Profil i stopień sjalilacji i fukozytacji AGP i FN stanowiły również przedmiot moich dalszych badań, których wyniki analizowano w kontekście leukocytospermii występującej u pacjentów podejrzanych o niepłodność, co przedstawiłam w pracy wchodzącej w skład omawianego osiągnięcia (praca nr 1).

W kolejnych latach moje badania objęły analizę stopnia i profilu fukozytacji również innych glikoprotein obecnych w ludzkiej plazmie nasienia, takich jak immunoglobulina G i cząsteczka wydzielnicza immunoglobuliny A (ang. secretory component; SC) (praca nr 2), a także dotyczyły analizy stopnia ekspresji kwasu sjalowego na wykrytych formach SC (praca nr 3) rozpatrywanej w przypadkach występowania leukocytospermii u potencjalnie niepłodnych mężczyzn. Badania dotyczące glikozylacji glikoprotein plazmy nasienia kontynuowałam włączając także analizę ekspresji O-glikanów, zarówno kompletnych, jak i skróconych do pojedynczej GalNAc (antygen Tn), oraz wielorozgałęzionych (trój- i cztero-antenowych) N-glikanów (praca nr 4). Prowadzone badania poszerzyłam następnie o analizę dodatkowych markerów biochemicznych obecnych w plazmie nasienia, takich jak enzymy proteolityczne z grupy metaloproteinaz (metaloproteinaza 9 i 2) oraz ich tkankowe inhibitory TIMP-1 i TIMP-2 (praca nr 5), wybrane parametry stresu oksydacyjnego (TAC i AOPP) (prace nr 5 i 6) oraz jeden ze znanych antyoksydantów – melatoninę (praca nr 6).

Celem przedstawionej rozprawy jest zaprezentowanie wyników serii badań, w których podjęto próbę analizy i scharakteryzowania wybranych parametrów istotnych z punktu widzenia męskiej płodności. Uzyskane wyniki badań, opublikowane w czasopiśmie z listy filadelfijskiej, wzbogacają naszą wiedzę o nowe aspekty związane z męską niepłodnością/obniżoną płodnością, stanowiąc równocześnie przyczynek do szerszej, uzupełnionej o dodatkowe parametry, diagnostyki mężczyzn borykających się z problemami płodności. Oznaczenie tych parametrów przyczyniło się także do wzbogacenia wiedzy na temat zależności między markerami biochemicznymi obecnymi w plazmie nasienia a stanem patofizjologicznym ejakulatu oraz pozwoliło na lepsze zrozumienie mechanizmów biochemicznych mających związek z potencjałem rozrodczym mężczyzn. Uzyskana wiedza może stać się przydatna w procedurach przygotowujących mężczyzn do technik wspomaganego rozrodu lub do zapłodnienia *in vitro*.

Piśmiennictwo do Wprowadzenia:

- Kątnik-Prastowska I, Kratz EM, Faundez R, Chełmońska-Soyta A. Lower expression of the alpha_{2,3}-sialylated fibronectin glycoform and appearance of the asialo-fibronectin glycoform are associated with high concentrations of fibronectin in human seminal plasma with abnormal semen parameters. *Clin Chem Lab Med.* 44, 1119-25 (2006).
- Kim ED, Lipshultz LI. Advances in the evaluation and treatment of the infertile man, *World J Urol.* 15, 378 - 93 (1997).
- Kowalska B, Kratz EM: Styl życia a bezpłodność męska. W: Promocja zdrowia, profilaktyka i opieka w chorobach przewlekłych - współczesne problemy. 2011; s.161-169, T.1; [red. nauk. Anna Abramczyk et al.]; Wrocław: A & A Optimed,. ISBN 83-912589-4-7.
- Kratz E, Poland DC, van Dijk W, Kątnik-Prastowska I. Alterations of branching and differential expression of sialic acid on alpha-1-acid glycoprotein in human seminal plasma. *Clin Chim Acta.* 331, 87-95 (2003).
- Kratz EM, Pupek M, Chełmońska-Soyta A, Kątnik-Prastowska I. Formy molekularne immunoglobuliny A w plazmie nasienia ludzkiego. *Adv.Clin.Exp.Med.* 13, 541-47 (2004).
- Kuczyński W, Szamatowicz J, Jędrzejczak P. Niepłodność męska. W: Niepłodność, pod redakcją Pisarskiego T, Szamatowicza M (PZWL, Warszawa 1997), str. 218 - 50.
- Poland DC, Kratz E, Vermeiden JP, De Groot SM, Bruyneel B, De Vries T, Van Dijk W. High level of alpha1-acid glycoprotein in human seminal plasma is associated with high branching and expression of Lewis(a) groups on its glycans: supporting evidence for a prostatic origin. *Prostate.* 52, 34-42 (2002).
- Purvis K, Christiansen E. Male infertility: current concepts, *Ann Med.* 24, 259 - 72 (1992).
- WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, fifth edition, WHO Press, World Health Organization, 20 Avenue Appia, 1211 Geneva 27, Switzerland, 2010.

Przebieg i otrzymane wyniki badań

Przedstawione poniżej pierwsze trzy prace są wynikiem badań obejmujących analizę profilu i stopnia glikozylacji wybranych glikoprotein obecnych w leukocytospermicznych ejakulatach pochodzących od pacjentów podejrzanych o niepłodność (26 - 45 lat; n = 27), w odniesieniu do grupy normozoospermicznych mężczyzn o udowodnionej płodności, posiadających co najmniej jedno dziecko w wieku do dwóch lat (przedział wiekowy odpowiadający grupie leukocytospermicznej; n = 18). Grupę normozoospermiczną stanowili mężczyźni o udowodnionej płodności, w których nasieniu liczba plemników była wyższa niż $15 \times 10^6/\text{ml}$, ponad 4% plemników miało prawidłową morfologię, całkowita liczba plemników ruchliwych wynosiła $\geq 40\%$ lub $\geq 32\%$ wykazywało ruch postępowy w badaniu przeprowadzonym do 1 godziny po ejakulacji. Zgodnie z kryteriami przyjętymi w roku 2010 przez Światową Organizację Zdrowia, w ejakulatach leukocytospermicznych liczba leukocytów była wyższa niż $1 \times 10^6/\text{ml}$. Żadna z prób leukocytospermicznych nie była normozoospermiczna.

Leukocyty są fizjologicznie obecne w męskim układzie rozrodczym, lecz rola jaką odgrywają w ludzkim ejakulacie jest kontrowersyjna. Niektórzy autorzy uważają, że leukocyty mogą odgrywać pozytywną rolę w nadzorze immunologicznym w nasieniu oraz w eliminowaniu poprzez fagocytozę morfologicznie zmienionych plemników. Z drugiej strony, obecność leukocytów w ejakulacie przekraczająca liczbę $1 \times 10^6/\text{ml}$, często towarzyszy upośledzonym parametrom nasienia. Podwyższona liczba leukocytów w ejakulacie jest związana z około 10 - 20% obniżeniem płodności lub występowaniem niepłodności u mężczyzn. Najczęściej leukocytospermia towarzyszy stanom zapalnym występującym w obrębie męskiego układu rozrodczego, jednakże nie jest to jedyna możliwa jej przyczyna. Podwyższona liczba leukocytów w nasieniu może być także spowodowana paleniem tytoniu, nadużywaniem alkoholu i marihuany, długotrwałą abstynencją seksualną i praktykami seksualnymi z wykorzystaniem produktów dopochwowych lub seksem analnym [omówiono w Kratz i wsp., *Reprod. Fertil. Dev.* 2014].

Sugeruje się, że zawartość L-fukozy w cząsteczkach glikanów obecnych na glikoproteinach plazmy nasienia, jak również jej lokalizacja w tych strukturach, może mieć wpływ na różne interakcje

mające miejsce podczas dojrzewania plemników, jak również na kaskadę reakcji prowadzących do procesu zapłodnienia. Inni autorzy wykazali, że oligosacharydy plazmy nasienia zawierające w swym składzie fukozę wchodzącą w skład glikotopów Lewis^x i/lub Lewis^y, obecne zarówno jako wolne oligosacharydy, jak i związane z glikokoniugatami, uczestniczą w wiązaniu plemnik - osłonka przejrzysta komórki jajowej, inicjującym proces zapłodnienia (omówiono w pracy nr 2).

Celem przeprowadzonych badań nie było szczegółowe określenie struktury jednostek węglowodanowych obecnych na glikoproteinach występujących w ludzkiej leukocytospermicznej plazmie nasienia, lecz analiza zmian we względnej zawartości glikotopów, dostępnych dla specyficznych lektyn. Oddziaływania z lektyną najprawdopodobniej odzwierciedlają podobnego typu interakcje, które mogą zachodzić *in vivo* między glikokoniugatami glikoprotein zawierającymi glikany konformacyjnie dostępne dla specyficznych dla nich endo- i egzogennych receptorów. Wyniki przedstawionych badań mogą stanowić podstawę do wytypowania dodatkowych parametrów pomocnych w wyborze odpowiedniej techniki wspomaganego rozrodu stosowanej u leukocytospermicznych pacjentów.

Pierwsza z omawianych prac [Kratz *EM* i wsp. *Fucose and sialic acid expressions in human seminal fibronectin and α 1-acid glycoprotein associated with leukocytospermia of infertile men. 2011, 31(5):317-325, Dis. Markers] jest wynikiem badań realizowanych pod moim kierunkiem w ramach działalności statutowej Katedry i Zakładu Chemii i Immunochemii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu (ST-562). Celem przeprowadzonych doświadczeń było porównanie stopnia ekspresji reszt fukozy i kwasu sjałowego na glikanach fibronektyny (FN) i białka ostrej fazy α ₁-kwaśnej glikoproteiny (AGP) obecnych w plazmie nasienia mężczyzn podejrzanych o niepłodność, z towarzyszącą leukocytospermią.*

Względna zawartość końcowych reszt cukrowych na glikanach FN i AGP w normozoospermicznych i leukocytospermicznych próbach plazm nasienia, była analizowana metodą lektyno-ELISA z wykorzystaniem biotynylowanych fukozo-specyficznych lektyn z *Aleuria aurantia* (AAL: fukoza przyłączona wiązaniem α 1,6< α 1,2< α 1,3), *Lotus tetragonolobus* (LTA: fukoza przyłączona wiązaniem α 1,3) i *Ulex europaeus* (UEA: fukoza przyłączona wiązaniem α 1,2) oraz sjałospecyficznych lektyn z *Maackia amurensis* (MAA: kwas sjałowy przyłączony wiązaniem α 2,3) i z *Sambucus nigra* (SNA: kwas sjałowy przyłączony wiązaniem α 2,6).

Na podstawie wyników przeprowadzonych badań można powiedzieć, że: (1) po raz pierwszy wykazano, że fibronektyna i α ₁-kwaśna glikoproteina obecne w plazmie nasienia są reaktywne z UEA, co może sugerować obecność glikoform zawierających w swej strukturze fukozę przyłączoną wiązaniem α 1,2. Ten typ fukozytacji prawdopodobnie odzwierciedla miejscową syntezę tkankową; (2) w leukocytospermii obserwowano na glikanach fibronektyny obniżoną ekspresję fukozy przyłączonej wiązaniem α 1,6, α 1,3 oraz α 1,2 (wykrywanej odpowiednio przez AAL, LTA i UEA) oraz wysoką ekspresję kwasu sjałowego przyłączonego wiązaniem α 2,3 i α 2,6 (reaktywnego odpowiednio z MAA i SNA). Stwierdzono także obecność w strukturze glikanów AGP MAA-reaktywnego kwasu sjałowego przyłączonego wiązaniem α 2,3 i LTA-reaktywnej fukozy przyłączonej wiązaniem α 1,3. Wiadomo, że obecność glikanów chroni FN przed degradacją i w związku z tym można wnioskować, że obserwowane zmiany w ekspresji końcowych reszt cukrowych mogą przekładać się na zmienioną fragmentację FN, a to z kolei może mieć wpływ na prawidłowy przebieg procesu upłynniania nasienia. Zaobserwowano również, że profil fukozytacji i sjałilacji glikanów FN i AGP obecnych w normozoospermicznej plazmie nasienia znacząco różni się od tego opisanego dla ich

odpowiedników w osoczu krwi. Podwyższona w leukocytospermii ekspresja na glikanach FN i AGP MAA-reaktywnego kwasu sialowego przyłączanego wiązaniem $\alpha 2,3$ oraz podwyższona reaktywność AGP z LTA, świadcząca o obecności fukozy przyłączonej wiązaniem $\alpha 1,3$, może być związana z obecnością stanu zapalnego w obrębie męskich narządów rozrodczych. Oznaczenie na AGP tych glikotopów, stanowiących część antygeny sialo-Lewis^x, może być pomocne w różnicowaniu pacjentów leukocytospermicznych z towarzyszącym stanem zapalnym od tych, u których stan zapalny nie występuje. Z uwagi na to, że stan zapalny może być powodem leukocytospermii, będącej czynnikiem, który często występuje u niepłodnych pacjentów, wczesnie podjęta decyzja o odpowiednim leczeniu stanu zapalnego może bezpośrednio wpływać na poprawę męskiej płodności.

Z immunologicznego punktu widzenia, zadaniem plazmy nasienia jest m.in. ochrona męskich komórek rozrodczych przed infekcjami oraz hamowanie patologicznej odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciw plemnikom zarówno w obrębie męskich, jak i żeńskich organów rozrodczych. Wspomniane właściwości hamujące plazmy nasienia wynikają z obecności czynników biologicznie aktywnych, takich jak enzymy, steroidy, hormony, białka, cytokiny i immunoglobuliny, głównie klasy G (IgG) i A (IgA). Główną rolą immunoglobuliny G jest rozpoznawanie, neutralizacja i eliminacja patogenów i toksycznych antygenów, natomiast wydzielnicza IgA zapobiega przenikaniu mikroorganizmów i innych antygenów przez błony śluzowe. Jest również odpowiedzialna za neutralizację wirusów i wzmacnia nieswoiste mechanizmy obronne (omówiono w pracy nr 2).

Nasze wcześniejsze badania [Kratz i Pupek, Adv. Clin. Exp. Med. 2004] pozwoliły na zaobserwowanie, że wysokie stężenia wydzielniczej IgA (ang. secretory immunoglobulin A, S-IgA) w ludzkiej plazmie nasienia nie wykazują związku z parametrami nasienia. Przeprowadzony immunobloting pozwolił na wykazanie, że cząsteczka wydzielnicza IgA (ang. secretory component, SC) występuje w dwóch formach, o masach cząsteczkowych około 80 i 60 kDa. Wyniki zamieszczone w kolejnej prezentowanej obecnie pracy pozwoliły na wykazanie zmian w stopniu i profilu fukozytacji IgG oraz SC, obecnych w plazmie nasienia, analizowanych w kontekście leukocytospermii obserwowanej u niepłodnych mężczyzn [Kratz EM i wsp. *Changes in fucosylation of human seminal IgG and secretory component of IgA in leukocytospermic patients*. 2014 Jan;31(1):51-60, *Glycoconj. J.*]. Biorąc pod uwagę fakt, że fukoza wchodząca w skład struktur cukrowych glikoprotein odgrywa istotną rolę w ich funkcjach biologicznych, fukozytacja immunoglobulin, ze względu na ich udział w odpowiedzi immunologicznej, może mieć kluczowe znaczenie.

Stężenia IgG oznaczono metodą radialnej immunodyfuzji, a stężenia S-IgA – za pomocą immunoenzymatycznego testu fazy stałej ELISA. Analizę stopnia i profilu fukozytacji glikanów IgG i SC IgA wykonano metodą lektyno-ELISA (IgG) oraz lektyno-blotingu (SC) z wykorzystaniem fukozospecyficznych lektyn z *Aleuria aurantia* (AAL: fukoza przyłączona wiązaniem $\alpha 1,6 < \alpha 1,2 < \alpha 1,3$), *Lotus tetragonolobus* (LTA: fukoza przyłączona wiązaniem $\alpha 1,3$) i *Ulex europaeus* (UEA: fukoza przyłączona wiązaniem $\alpha 1,2$). Wyniki naszych badań po raz pierwszy ukazują profil i stopień fukozytacji IgG i SC obecnych w ludzkiej plazmie nasienia. Z wyników przeprowadzonych doświadczeń można wyciągnąć sześć głównych wniosków. (1) W leukocytospermicznych plazmach nasienia średnie stężenia IgG i S-IgA są dwa razy wyższe niż w kontrolnej grupie normozoospermicznej. (2) Glikany IgG i SC obecnych w plazmie nasienia posiadają rdzeniową fukozę, jak również fukozę antenową wchodzącą w skład struktur cukrowych typu Lewis^y i Lewis^x, reaktywną odpowiednio z UEA i LTA. (3) IgG obecna w próbach leukocytospermicznych charakteryzuje się obniżoną ekspresją

AAL-reaktywnej fukozy rdzeniowej w porównaniu z grupą kontrolną. (4) W ludzkiej plazmie nasienia SC jest obecna w dwóch formach: 78 kDa and 63 kDa, różniących się ekspresją fukozy. (5) W grupie kontrolnych plazm nasienia obserwowano wyższą reaktywność z AAL i LTA glikanów obecnych na 63-kDa formie SC w porównaniu z 78-kDa SC. (6) W leukocytospermii stwierdzono niższe wartości reaktywności fukozy rdzeniowej oraz fukozy wchodzącej w skład struktur Lewis^x na 63-kDa SC, lecz były one takie same dla obydwu form SC.

Podsumowując, wyniki badań fukozyzacji IgG i SC plazmy nasienia wskazują na pewne zmiany związane z chorobą. Jeżeli analiza czułości i swoistości wykazanych zmian będzie także zadowalająca, charakterystyczne cechy glikozylacji mogą stać się kolejnym cennym narzędziem diagnostycznym w ocenie niepłodności z towarzyszącą leukocytospermią. Różnice w ekspresji fukozy mogą mieć szczególne znaczenie dla właściwego funkcjonowania obydwu form SC, występujących zarówno w postaci wolnej, jak i związanej. Wyniki naszych badań sugerują, że obniżenie w leukocytospermicznych plazmach nasienia zawartości fukozy zarówno rdzeniowej, jak i wchodzącej w skład struktur cukrowych typu Lewis^x obecnej na glikanach SC o masie cząsteczkowej 63 kDa, może wpływać na skuteczność SC w obronie przeciwko wewnętrznym infekcjom w obrębie męskiego układu rozrodczego. Analiza statusu fukozyzacji IgG i SC oraz oznaczenie stężenia IgG i S-IgA w plazmie nasienia może stać się kolejnym wartościowym narzędziem diagnostycznym w ocenie męskiej niepłodności związanej z leukocytospermią, z towarzyszącym stanem zapalnym.

Uzyskane wyniki analizy stopnia i profilu fukozyzacji SC zachęciły mnie do kontynuacji badań mających na celu sprawdzenie, czy istnieją zależności między sjalilacją SC a leukocytospermią, a trzecia z cyklu prezentowanych prac jest tego dowodem [**Kratz EM, Ferens-Sieczkowska M. Association of IgA secretory component sialylation with leucocytospermia of infertile men - a pilot study. 2014 Dec;46(10):1200-1202, Andrologia**].

Cząsteczka wydzielnicza (SC) jest glikoproteiną o masie cząsteczkowej 50-90 kDa, syntetyzowaną przez komórki epitelialne, także te obecne w drogach moczowo-płciowych. SC, zarówno ta przyłączona do immunoglobuliny A lub M, jak i ta występująca w formie wolnej w wydzielinach, jest w wysokim stopniu glikozylowana. Prawie 70% N-glikanów SC zawiera w swej strukturze kwas sjalowy, ponad 65% glikanów jest fukozylowanych, a cukry te wchodzą w skład struktur oligosacharydowych typu Lewis- i/lub sjalo-Lewis odpowiedzialnych za specyficzne wiązanie z lektynami oraz bakteryjnymi adhezynami. Infekcje bakteryjne i stany zapalne w obrębie męskich dróg moczowo-płciowych mogą manifestować się zwiększoną liczbą leukocytów w nasieniu. Reakcja glikanów cząsteczki wydzielniczej IgA z adhezynami bakteryjnymi jest jednym z mechanizmów zaangażowanych w zwalczanie infekcji, a kwas sjalowy jest kluczowym monosacharydem uczestniczącym w tym wiązaniu.

Celem przeprowadzonych badań było sprawdzenie, czy ewentualne różnice w sjalilacji SC IgA obecnej w plazmie nasienia są związane z leukocytospermią. Zarówno w normozoospermicznych, jak i leukocytospermicznych plazmach nasienia, wykazano obecność dwóch immunoreaktywnych pasm o masach cząsteczkowych 78-kDa i 63-kDa, odpowiadających cząsteczce wydzielniczej. Stopień sjalilacji cząsteczki wydzielniczej analizowano w lektyno-blotingu z wykorzystaniem sjalo-specyficznych lektyn MAA (*Maackia amurensis* agglutinin) i SNA (*Sambucus nigra* agglutinin), wykrywających odpowiednio kwas sjalowy przyłączony wiązaniem α 2,3 oraz wiązaniem α 2,6. W immunoblotingu z przeciwciałami specyficznymi wobec SC IgA wykazano, że względna zawartość obydwu form SC była nieco zmieniona w próbach leukocytospermicznych (83,5 i 77,5% formy

o masie cząsteczkowej 78-kDa oraz 16,5 i 22,5% formy o masie cząsteczkowej 63-kDa, odpowiednio dla normozoospermii i leukocytospermii). Względna reaktywność z MAA i SNA fragmentu SC o masie cząsteczkowej 63 kDa we wszystkich przypadkach była wyższa (36,3 - 39,6 %) niż obserwowana zawartość białka (16,5 - 22,5%). Powyższa zależność może sugerować, że ekspresja kwasu sjałowego na glikanach formy SC o masie cząsteczkowej 63 kDa jest wyższa niż na formie 78-kDa. Aby zweryfikować tę hipotezę, obliczono specyficzną reaktywność z lektynami definiowaną jako stosunek reaktywności z lektyną do zawartości białka. Specyficzna reaktywność z MAA i SNA cząsteczki wydzielniczej o masie cząsteczkowej 63 kDa w obydwu analizowanych grupach plazmy nasienia była wyższa niż formy SC o masie 78 kDa. Obserwacje nasze wskazują, że powyższa tendencja jest silniejsza w grupie normozoospermicznej niż w próbach leukocytospermicznych. Stwierdzono również, że względna zawartość kwasu sjałowego SNA-reaktywnego na SC o masie cząsteczkowej 78 kDa jest wyraźnie wyższa w leukocytospermii niż w grupie normozoospermicznej.

Wykazane zależności były analogiczne do tych obserwowanych dla fukozytacji obydwu form SC (praca nr 2). Zmiany w sjałilacji także mogą modyfikować zdolność SC do wiązania adhezyn bakteryjnych w trakcie infekcji dróg moczowo-płciowych i w ten sposób wpływać na skuteczność obrony antybakteryjnej. Ponadto zmiany w strukturze glikanów mogą zwiększać podatność SC na proteolityczną degradację prowadząc do jej eliminacji, co w konsekwencji także wpływa na skuteczność SC w obronie przeciw wewnętrznym infekcjom.

Przyszłe badania mające na celu wyjaśnienie pochodzenia oraz strukturalnych różnic między obydwoma formami SC plazmy nasienia, jak również różnic w ich glikozylacji, wydają się być istotne, z uwagi na to, że zmieniona ekspresja kwasu sjałowego może mieć duże znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania SC. Analiza sjałilacji (podobnie jak i fukozytacji) SC plazmy nasienia może stanowić kolejne przydatne narzędzie diagnostyczne do oceny niepłodności związanej z leukocytospermią, z towarzyszącym stanem zapalnym.

Kolejna praca wchodząca w skład omawianego osiągnięcia [**Kratz EM i wsp.** *The analysis of sialylation, N-glycan branching and expression of O-glycans in seminal plasma of infertile men.* 2015;2015:941871, *Dis. Markers.* doi: 10.1155/2015/941871. Epub 2015 Mar 29] jest kontynuacją badań mających na celu analizę glikozylacji glikoprotein ludzkiej plazmy nasienia, obecnie realizowanych w ramach grantu Narodowego Centrum Nauki (Nr 786/2012), w którym jestem głównym wykonawcą.

Rola białek obecnych w ludzkiej plazmie nasienia w pomyślnym przebiegu procesu zapłodnienia nadal nie jest do końca wyjaśniona, gdyż brakuje danych doświadczalnych, które mogłyby rzucić nieco światła na ten problem. Warto jednak zwrócić uwagę na pewne wnioski płynące z badań na zwierzętach. Sugeruje się na przykład, że jedną z ról plazmy nasienia może być „wspieranie” plemników w pokonywaniu przez nie bariery śluzu szyjkowego oraz w ich migracji przez szyjkę macicy. Odnotowano także szkodliwy wpływ białek plazmy nasienia na prawidłowy przebieg końcowego etapu procesu zapłodnienia. Do tej pory nie wyjaśniono jednak do końca molekularnego aspektu tych procesów. Z uwagi na to, że oddziaływanie białko – węglowodany są znanym mechanizmem regulacyjnym, powstaje pytanie, czy zmiany w profilu glikozylacji plazmy nasienia mogą wpływać na interakcje mające na celu utrzymanie witalności plemników i pomoc w ich przechodzeniu przez szyjkę macicy. Wyjątkowe cechy glikozylacji plazmy nasienia wydają się obiecującym parametrem i mogą być pomocne w wyjaśnieniu powyższych procesów.

Jakkolwiek znane są wyniki wcześniejszych badań nad glikozylacją białek plazmy nasienia, całkowity profil glikozylacji analizowany jako czynnik wpływający na męską płodność nie był szczegółowo badany. Celem przeprowadzonych badań była ogólna analiza wybranych cech glikozylacji, która pozwoliłaby na uzyskanie informacji, czy całkowity profil glikozylacji glikoprotein nasienia może być związany z męskim potencjałem rozrodczym. Autorzy, którzy wcześniej badali glikozylację glikoprotein plazmy nasienia, zwrócili uwagę to, że w chorobach prostaty, na PSA obserwuje się wysoką ekspresję wielo-rozgałęzionych glikanów trój- i cztero-antenowych. Obecność takich struktur cukrowych została potwierdzona także w naszych badaniach w reakcji z lektyną PHA-L.

W przeprowadzonych badaniach porównano wybrane cechy glikozylacji glikoprotein plazm nasienia pochodzących od płodnych normozoospermicznych ($n = 38$) i niepłodnych mężczyzn przygotowywanych do sztucznego zapłodnienia metodą inseminacji (ang. artificial insemination, AI) [grupy: normo- (prawidłowe parametry nasienia; $n = 67$), asteno- (upośledzony ruch plemników; $n = 27$), oligo- (obniżona liczba plemników; $n = 15$) i oligoastenoospermiczna (obniżona liczba i upośledzony ruch plemników; $n = 22$)]. Grupy plazm nasienia scharakteryzowano i wyodrębniono na podstawie wyników standardowej oceny nasienia, zgodnie z wytycznymi Światowej Organizacji Zdrowia z 2010 roku.

Stopień i profil sialylacji analizowano metodą fazy stałej lektyno-ELISA z wykorzystaniem dwóch biotynylowanych lektyn: *Maackia amurensis* agglutinin - MAA i *Sambucus nigra* agglutinin - SNA, rozpoznających kwas sjałowy przyłączony odpowiednio wiązaniem $\alpha 2,3$ i $\alpha 2,6$. Stopień ekspresji O-glikanów analizowano za pomocą biotynylowanych lektyn: *Maclura pomifera* lectin - MPL i *Vicia villosa* lectin – VVL, rozpoznających odpowiednio kompletne struktury O-glikanów oraz ich formy skrócone do pojedynczej GalNAc (antygen Tn), natomiast obecność wielo-rozgałęzionych N-glikanów (trój- i cztero-antenowych) wykazano w reakcji z lektyną *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin - PHA-L, specyficznej wobec GlcNAc przyłączonej wiązaniem $\beta 1,6$, obecnej na trzeciej antenie glikanów.

Otrzymane wyniki pozwalają na sformułowanie następujących wniosków: (1) w ludzkiej plazmie nasienia można zaobserwować obecność i zmiany w ekspresji O-związanych glikanów; (2) ekspresja SNA-reaktywnego kwasu sjałowego jest znacznie niższa w grupie astenoospermicznej niż w obydwu grupach normozoospermicznych płodnych i niepłodnych mężczyzn; (3) ekspresja PHA-L-reaktywnych wielorozgałęzionych N-glikanów była znacząco niższa u oligozoospermicznych pacjentów niż w obydwu grupach normozoospermicznych. Powyższe obserwacje potwierdziła przeprowadzona analiza korelacji między badanymi parametrami a cechami nasienia. Wykazano istnienie pozytywnej korelacji między obecnością PHA-L-reaktywnych wielo-rozgałęzionych N-glikanów a obniżoną liczbą plemników w ejakulacie. Natomiast obniżona ekspresja SNA-reaktywnego kwasu sjałowego przyłączonego wiązaniem $\alpha 2,6$, wydaje się być związana z upośledzeniem ruchliwości plemników.

Glikozylacja białek plazmy nasienia zasługuje na bardziej szczegółowe badania, które mogą być pomocne w znalezieniu powiązań między profilem glikozylacji i męskim potencjałem rozrodczym oraz w wytłumaczeniu roli jaką odgrywają reszty cukrowe glikoprotein w reakcjach regulujących proces zapłodnienia. Wydaje się, że stopień rozgałęzienia oligosacharydów, ekspresja O-glikanów, jak również obecność kwasu sjałowego, mogą być uważane za istotne elementy, które mają wpływ na utrzymanie plemników w takim stanie, który umożliwia im połączenie się z komórką jajową. Nawet niewielkie różnice w glikozylacji mogą mieć decydujące znaczenie w przypadku glikoprotein tak ważnych dla prawidłowego przebiegu procesu zapłodnienia, jak np. glikodelina S. Takie zmiany mogą

być trudne do wykrycia w pełnym materiale ze względu na niskie stężenia niektórych glikoprotein. Trzeba również brać pod uwagę, że profil glikozylacji może być odmienny dla poszczególnych glikoprotein, a wyniki przeprowadzonej analizy są wartościami uśrednionymi dla puli glikoprotein plazmy nasienia. W kolejnych badaniach skupimy się na wytypowaniu modelowych białek, dla których analiza glikozylacji będzie relatywnie łatwa, i które będą najlepiej odzwierciedlały profil glikozylacji glikoprotein ludzkiej plazmy nasienia, co z kolei pozwoli na ukazanie bardziej znaczących różnic pomiędzy badanymi próbkami plazmy nasienia. Wskazanie odpowiednich lektyn, które umożliwiłyby możliwie dokładne określenie profilu glikanów wydaje się być dobrym uzupełnieniem analizy wykonanej metodą spektrometrii masowej. Także poszerzenie przez nas panelu używanych dotąd lektyn wydaje się mieć zastosowanie do dalszych badań.

Kolejnym zagadnieniem, które mnie zainteresowało był status oksydacyjno-antyoksydacyjny ludzkiego nasienia oraz zależności pomiędzy poziomem parametrów stresu oksydacyjnego a stanem patofizjologicznym ejakulatu oraz ekspresją enzymów proteolitycznych z grupy metaloproteinaz (żelatynazy) i ich tkankowych inhibitorów. Materiał badany stanowiły plazmy nasienia pochodzące od niepłodnych mężczyzn przygotowywanych do sztucznego zapłodnienia metodą inseminacji (grupy: normo-, asteno-, oligo- i oligoastenozoospermiczna). Grupę kontrolną stanowili zdrowi normozoospermiczni mężczyźni o udowodnionej płodności. Charakterystykę i liczebność badanych grup przedstawiono przy omawianiu wyników poprzednich badań (praca nr 4). Sztuczne zapłodnienie metodą inseminacji jest szeroko stosowane w leczeniu męskiej niepłodności i szczególnie preferowane przy oligozoospermii. Z uwagi na to, że zabieg sztucznego zapłodnienia nie zawsze jest skuteczny za pierwszym razem i w niektórych przypadkach wymaga powtórzenia, byliśmy zainteresowani oznaczeniem dodatkowych parametrów biochemicznych, które mogłyby być przydatne do lepszej charakterystyki nasienia użytego do inseminacji.

Przedstawione w tej pracy badania [**Kratz EM** i wsp. *Gelatinases and their tissue inhibitors are associated with oxidative stress: a potential set of markers connected with male infertility. 2015 Jan 7, Reprod. Fertil. Dev. doi: 10.1071/RD14268. Epub ahead of print*], których byłam pomysłodawcą, wchodziły w zakres projektu przedstawionego przeze mnie do konkursu o przyznanie 10-miesięcznego podoktorskiego stypendium naukowego w ramach projektu pn. "Program rozwoju Akademii Medycznej we Wrocławiu," realizowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego, Program Operacyjny Kapitał Ludzki (01.03.-31.12.2011; umowa nr UDA-POKL.04.01.01-00-010/08-01). Badania częściowo przeprowadzono w ramach projektu badawczego dla młodych naukowców (5/Pbmn), realizowanego w Katedrze i Zakładzie Chemii i Immunochemii Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, w którym pełniłam rolę opiekuna naukowego i wykonawcy.

Oprócz cech fizjologicznych plemników, takich jak budowa, liczba i ruchliwość, o ich zdolności do zapłodnienia mogą także decydować mało jeszcze poznane parametry biochemiczne nasienia, włącznie ze składnikami wydzielanymi przez komórki jąder, pęcherzyków nasiennych i prostaty, takimi jak metaloproteinazy (MMP) i ich tkankowe inhibitory (TIMP). Jakkolwiek ekspresja żelatynaz A i B (odpowiednio: MMP-2 i MMP-9) oraz ich tkankowych inhibitorów (odpowiednio: TIMP-1 i TIMP-2) w ludzkiej plazmie nasienia była wcześniej analizowana przez innych badaczy, niewiele wiadomo o zależnościach pomiędzy MMP i TIMP a stresem oksydacyjnym w ludzkim ejakulacie. Wprawdzie całkowitą pojemność antyoksydacyjną (ang. total antioxidant capacity, TAC) plazmy nasienia oznaczano także wcześniej w innych ośrodkach badawczych, jednakże brak informacji

o stężeniu zaawansowanych produktów utleniania białek (ang. advanced oxidation protein products, AOPP), które powstają na skutek działania stresu oksydacyjnego.

Stres oksydacyjny jest uważany za jedną z potencjalnych przyczyn niepłodności męskiej. W ejakulatach wielu niepłodnych mężczyzn wykryto podwyższony poziom reaktywnych form tlenu (ang. reactive oxygen species, ROS). W warunkach fizjologicznych w męskim układzie rozrodczym istnieje dobrze kontrolowana równowaga między powstawaniem ROS a aktywnością antyoksydantów, które je wychwytyją. Wszelkie zaburzenia tej równowagi mogą prowadzić do uszkodzenia makrocząsteczek oraz zakłóceń w ich funkcji, np. poprzez indukowanie peroksydacji lipidów i modyfikację białek oraz uszkodzeń DNA. Jakkolwiek plemniki również mogą generować powstawanie ROS, które w niewielkim stężeniu odgrywają istotną pozytywną rolę w procesie zapłodnienia, liczba powstających ROS musi być utrzymywana na poziomie fizjologicznym z uwagi na to, że zarówno powstające jak i dojrzałe plemniki są szczególnie wrażliwe na stres oksydacyjny. Z drugiej strony, wysokie stężenia ROS w plazmie nasienia są zazwyczaj związane z podwyższonym stężeniem białek chroniących przed stresem oksydacyjnym, takich jak enzymy pełniące rolę antyutleniaczy. Jednakże wysokie stężenia ROS mogą prowadzić do powstawania białek modyfikowanych w procesie utleniania, co może przyczynić się do męskiej niepłodności. AOPP obecne w osoczu krwi są definiowane jako usieciowane białka zawierające di-tyrozynę, utworzone w wyniku utleniania aminokwasów przez ROS. Są to głównie agregaty i/lub fragmenty albuminy uszkodzonej przez stres oksydacyjny, ale jest możliwe, że mogą one być tworzone także przez inne białka osocza. Jest prawdopodobne, że analogiczny mechanizm tworzenia AOPP ma miejsce w plazmie nasienia, co może mieć negatywny wpływ na prawidłowy rozwój plemników prowadząc do niepłodności. Dlatego też pomiar stężeń AOPP w ludzkiej plazmie nasienia może umożliwić wytypowanie dobrego parametru świadczącego o uczestnictwie stresu oksydacyjnego w powstawaniu niepłodności.

Żelatynazy, enzymy proteolityczne z grupy metaloproteinaz, wraz z ich tkankowymi inhibitorami, uczestniczą w procesie upłynniania nasienia, niezbędnym dla prawidłowego funkcjonowania plemników, a stres oksydacyjny wpływa na kondycję plemników. Z uwagi na to, że w różnych procesach patofizjologicznych ekspresja i aktywność MMP może być regulowana przez stres oksydacyjny, analiza obecności MMP w plazmie nasienia, jak również zależności między ich ekspresją i wartościami parametrów stresu oksydacyjnego, jest interesująca i warta rozpatrzenia w kontekście męskiej płodności. Nasze badania koncentrowały się na zbadaniu zależności pomiędzy stężeniami żelatynaz B i A oraz ich tkankowych inhibitorów TIMP-1 i TIMP-2 a wydajnością systemu antyoksydacyjnego w nasieniu. Stężenia MMP i TIMP oznaczono immunoenzymatyczną metodą fazy stałej ELISA, natomiast stężenie TAC, świadczące o zdolności do redukcji nadmiaru wolnych rodników, oraz stężenie AOPP oznaczono metodą spektrofotometryczną.

Interesowało nas czy istnieje zależność pomiędzy stopniem ekspresji zespołu analizowanych parametrów a liczbą i ruchliwością plemników. W grupie niepłodnych pacjentów stężenia MMP-9 były wyższe niż u płodnych mężczyzn, natomiast nie zauważono znaczących różnic między tymi grupami w stężeniach MMP-2. Stężenia TIMP-1 i TIMP-2 były podobne w grupie płodnych i niepłodnych mężczyzn. Obserwowano znacząco wyższe stężenia TAC w plazmach nasienia niepłodnych mężczyzn z grup normozoospermicznej i oligozoospermicznej, natomiast stężenia AOPP były wyższe w grupach niepłodnych pacjentów normo-, asteno- i oligozoospermicznych, niż w grupie mężczyzn płodnych.

Z uwagi na to, że otrzymane przez nas wyniki stężeń TAC były wyższe w grupach pacjentów niepłodnych, są one w sprzeczności do tych podanych w niektórych doniesieniach na temat statusu oksydacyjno-antyoksydacyjnego ludzkiej plazmy nasienia. Z drugiej jednak strony dostępne są także

dane mówiące o tym, że poziom całkowitej pojemności antyoksydacyjnej u pacjentów cierpiących na niepłodność idiopatyczną był znacząco niższy niż w grupie płodnych pacjentów, co wskazuje na to, że TAC może przyczynić się do męskiej niepłodności, niezależnie od wyników standardowej oceny nasienia. Stężenie TAC odzwierciedla wpływ antyoksydantów niskocząsteczkowych, lecz nie uwzględnia aktywności endogennych enzymów antyoksydacyjnych (np. katalazy) czy białek wiążących metale, co przynajmniej częściowo może wyjaśniać, dlaczego nie wykazaliśmy związku między wartościami stężeń TAC a parametrami nasienia. Warto wspomnieć, że zarówno synteza, jak i aktywność znanego antyutleniacza GSH, może być stymulowana przez suplementację innymi antyutleniaczami, takimi jak cysteina i inozytol. Nie można więc wykluczyć, że substancje te mogły mieć wpływ na podwyższony poziom TAC (i prawdopodobnie ekspresję MMP-9) w plazmach nasienia badanych przez nas niepłodnych mężczyzn. Jednakże nie mieliśmy informacji o tym czy i jakie antyutleniacze mogły być przyjmowane w postaci suplementów przez badanych przez nas niepłodnych pacjentów. Powszechny dostęp do informacji na temat wpływu zdrowego stylu życia i zdrowej diety na męską płodność mógł być powodem tego, że pacjenci o obniżonej płodności próbowali poprawić swój stan zdrowia przed zabiegiem inseminacji, na przykład poprzez zmianę nawyków żywieniowych, stylu życia czy wyeliminowanie uzależnień. Nie można też wykluczyć przyjmowania łatwo dostępnych w handlu antyutleniaczy, takich jak witamina A, C, E, GSH i koenzym Q10, które mogą przyczynić się do poprawy męskiego potencjału rozrodczego, szczególnie u pacjentów o obniżonej płodności spowodowanej stresem oksydacyjnym.

Wysokie stężenia AOPP łącznie z podwyższonym stosunkiem MMP-9/TIMP-1 świadczą o zaburzonej równowadze oksydacyjno-antyoksydacyjnej ejakulatu, co z kolei może negatywnie wpływać na męską płodność, a zatem parametry te mogą stać się przydatne jako dodatkowe narzędzie diagnostyczne określające jakość nasienia i potencjał rozrodczy mężczyzn.

Specyficzna ekspresja żelatynaz oraz regulacja ich wydzielania przez endogenne inhibitory w powiązaniu z markerami równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej, mogą stanowić część szeregu mechanizmów regulujących męską płodność, również tych zależnych od liczby plemników. W celu sprawdzenia, czy zestaw sześciu analizowanych przez nas parametrów może być stosowany do odróżniania próbek w sposób odzwierciedlający ich cechy kliniczne, przeprowadzono analizę klastrową. Spośród trzech utworzonych klastrów, dwa wydają się różnić pod względem charakterystyki klinicznej pacjentów: próby pochodzące od płodnych mężczyzn były zebrane w klastrze nr 3, natomiast klaster nr 1 zgrupował plazmy nasienia pochodzące w znacznej liczbie od pacjentów, którzy byli poddawani zabiegowi AI więcej niż jeden raz. Te wstępne ustalenia wymagają sprawdzenia w dalszych badaniach, z uwzględnieniem szczegółowych danych na temat skuteczności AI, ale potwierdzają hipotezę, że proponowany zestaw parametrów, zawierający żelatynazy i ich inhibitory, wzbogacony o czynniki informujące o statusie oksydacyjno-antyoksydacyjnym nasienia, może dostarczyć cennych informacji przydatnych w prognozowaniu skuteczności AI. Wyniki analizy stężeń MMP oraz TIMP obecnych w plazmie nasienia wraz z oceną parametrów stresu oksydacyjnego, mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia mechanizmów męskiej niepłodności oraz stać się podstawą do wytypowania dodatkowych użytecznych parametrów diagnostycznych świadczących o jakości nasienia i potencjału rozrodczego mężczyzn przygotowywanych do AI. To z kolei może zaowocować wzrostem liczby zwińczonych sukcesem zabiegów inseminacji. Wart zbadania może być także aspekt związany z suplementacją mężczyzn antyutleniaczami, szczególnie w odniesieniu do odpowiednich dawek, rozpatrywany w kontekście sztucznego zapłodnienia metodą inseminacji i zapłodnienia *in vitro*.

Uzyskane wyniki opisanych wyżej doświadczeń zainspirowały mnie do zaplanowania i przeprowadzenia kolejnych badań, pozwalających na poszerzenie wiedzy na temat zależności między równowagą oksydacyjno-antyoksydacyjną w plazmie nasienia a stanem patofizjologicznym nasienia, rozpatrywanych w kontekście męskiej niepłodności.

Przedstawione w publikacji rezultaty badań [**Kratz EM i wsp.** *Decreased melatonin levels and increased levels of advanced oxidation protein products in the seminal plasma are related to male infertility. 2014 Sep 12, *Reprod. Fertil. Dev.* doi: 10.1071/RD14165. Epub ahead of print*] są wynikiem współpracy z: (1) Institute of Pathophysiology and Allergy Research, Center for Pathophysiology, Infectiology and Immunology, Medical University of Vienna, Austria; (2) Department of Animal Physiology and Ethiology, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Bratislava, Slovak Republic; (3) Katedrą i Zakładem Toksykologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, oraz wynikiem mojego pobytu na 3-tygodniowym stażu naukowym (09.06.-30.06.2013). Staż ten odbyłam na zaproszenie prof. Theresii Thalhammer w Department of Pathophysiology and Allergy Research at the Center of Pathophysiology, Infectiology and Immunology, group of Cellular Pathology and Pharmacokinetics, Medical University in Vienna, Austria.

Celem przeprowadzonych doświadczeń była analiza wydajności układu antyoksydacyjnego w plazmach nasienia pochodzących od niepłodnych mężczyzn azoospermicznych (brak plemników w ejakulacie; n = 37) i teratozoospermicznych (nieprawidłowa budowa plemników; n = 29) oraz w grupie kontrolnej płodnych mężczyzn normozoospermicznych (n = 37), sklasyfikowanych na podstawie standardowego badania nasienia przeprowadzonego zgodnie z wytycznymi WHO z 2010 roku. Określenie poziomu parametrów stresu oksydacyjnego w powiązaniu ze stężeniem melatoniny w nasieniu może przyczynić się do lepszego zrozumienia mechanizmów regulujących równowagę oksydacyjno-antyoksydacyjną w ludzkim ejakulacie.

Melatonina, indoloamina wydzielana przez szyszynkę, jest znana jako silny „zmiatacz” wolnych rodników oraz antyutleniacz o szerokim spektrum działania, który jest także zdolny do indukcji enzymów antyutleniających. Udowodniono także, że melatonina może przywrócić prawidłową czynność jąder i jakość plemników nawet w warunkach patologicznych, np. w hiperlipidemii. Melatonina może wpływać na hiperaktywację plemników chomika przez stymulację ruchliwości wici, co bezpośrednio przekłada się na sukces w penetracji osłonki przejrzystej i zapłodnienia oocytu. Ponadto inkubowanie plemników z melatoniną poprawia ich ruchliwość i przedłuża żywotność. Melatonina jest łatwo rozpuszczalna zarówno w środowiskach wodnych jak i lipidowych i może łatwo przenikać przez barierę krew-jądro. To pozwala przypuszczać, że melatonina obecna w plazmie nasienia przedostała się z krwi i jest produkowana przez szyszynkę. Produkcja melatoniny przez pęcherzyki nasienne i/lub gruczoł krokowy nie została do tej pory potwierdzona, lecz nie można tego wykluczyć, gdyż obserwowane wysokie stężenia melatoniny w niektórych narządach wskazują na jej syntezę poza szyszynką.

Celem naszych badań było sprawdzenie, czy istnieją zależności pomiędzy markerem oksydacyjnego uszkodzenia białek (AOPP) oraz całkowitą pojemnością antyoksydacyjną (TAC) a stężeniem melatoniny w plazmach nasienia mężczyzn azoo- i teratozoospermicznych. Stężenie melatoniny oznaczono metodą radioimmunologiczną, a stężenia AOPP oraz TAC - metodami spektrofotometrycznymi. Wartości stężeń melatoniny i AOPP znacznie różniły się pomiędzy grupami azoospermiczną i teratozoospermiczną a grupą płodnych mężczyzn i korelowały ze sobą negatywnie.

Stężenia TAC były znacząco wyższe w azoospermii niż w teratozoospermii i w grupie kontrolnej. W grupie azoospermicznej także stężenia AOPP były istotnie wyższe niż te obserwowane w teratozoospermii. Przypuszczamy, że tworzenie AOPP plazmy nasienia może dotyczyć nie tylko albuminy lecz także innych białek, także tych odgrywających kluczową rolę w spermatogenezie, ich powstawanie może mieć negatywny wpływ na prawidłowy rozwój plemników prowadząc do niepłodności. Hipotezę tę wydają się potwierdzać zaobserwowane przez nas wyższe stężenia AOPP w plazmach nasienia pacjentów z azoospermią niż w grupie teratozoospermicznej. Podobnie jak to miało miejsce w poprzednio opisanych badaniach (praca nr 5) otrzymane wyniki stężeń TAC były wyższe w grupach pacjentów niepłodnych niż w grupie płodnych mężczyzn. Nie można jednak wykluczyć, że niepłodni pacjenci wchodzący w skład analizowanych przez nas grup, przyjmowali łatwo dostępne w handlu antyutleniacze próbując w ten sposób poprawić swój potencjał rozrodczy, równocześnie wpływając na podniesienie poziomu TAC w plazmie nasienia. Jednakże brak informacji, które by weryfikowały to założenie.

W naszych badaniach wykazaliśmy, że w plazmach nasienia płodnych mężczyzn wysokie stężenia melatoniny odpowiadają obniżonym stężeniom AOPP, natomiast w plazmach nasienia pacjentów azoo- i teratozoospermicznych, znaczne obniżenie stężeń melatoniny korelowało z podwyższonymi stężeniami AOPP. Dlatego też wartości stężeń melatoniny i AOPP mogą stać się pomocnym narzędziem diagnostycznym świadczącym o jakości nasienia i męskim potencjale rozrodczym.

Podsumowując, wyniki naszych badań sugerują, że oznaczanie stężenia melatoniny może być bardziej miarodajne niż TAC w określeniu zdolności antyoksydacyjnej ludzkiego nasienia. Jakkolwiek melatonina zazwyczaj nie jest parametrem oznaczanym standardowo przy ocenie męskiej płodności, wydaje się być lepszym i dokładniejszym niż TAC parametrem odzwierciedlającym właściwości antyoksydacyjne ludzkiego ejakulatu, dlatego, łącznie z AOPP, powinna być w przyszłości oznaczona w grupach o większej liczbie pacjentów. Dane uzyskane z tak przeprowadzonych badań mogą dostarczyć dalszych informacji na temat konieczności ewentualnej suplementacji antyutleniaczami (z uwzględnieniem melatoniny) niepłodnych mężczyzn przygotowanych do zapłodnienia *in vitro*.

Podsumowanie

W trzech pierwszych pracach przedstawiono wyniki analiz profilu i stopnia glikozylacji wybranych glikoprotein: FN i AGP (praca nr 1), IgG i SC (prace nr 2 i 3) w leukocytospermicznych ejakulatach pochodzących od pacjentów podejrzanych o niepłodność, w odniesieniu do grupy normozoospermicznych mężczyzn o udowodnionej płodności.

Otrzymano następujące wyniki:

1. Po raz pierwszy wykazano, że glikotopy obecne na FN i AGP plazmy nasienia reagują z lektyną UEA zarówno w grupie normozoospermicznej, jak i leukocytospermicznej, co może świadczyć o obecności fukozy przyłączonej wiązaniem $\alpha 1,2$. Reaktywność ta prawdopodobnie odzwierciedla miejscową syntezę tkankową (praca nr 1).
2. Leukocytospermia związana z podwyższoną ekspresją na glikanach FN i AGP MAA-reaktywnego kwasu sialowego przyłączonego wiązaniem $\alpha 2,3$ oraz podwyższona reaktywność AGP z lektyną LTA, świadcząca o obecności fukozy przyłączonej wiązaniem $\alpha 1,3$ może być związana z obecnością stanu zapalnego w obrębie męskich narządów rozrodczych. Oznaczenie na AGP tych glikotopów, stanowiących część antygeny sialyl-Lewis^x, może być pomocne w różnicowaniu pacjentów

leukocytospermicznych z towarzyszącym stanem zapalnym od tych, u których stan zapalny nie występuje (praca nr 1).

3. Zarówno w normozoospermicznych, jak i leukocytospermicznych plazmach nasienia, wykazano obecność dwóch immunoreaktywnych pasm o masach cząsteczkowych 78 kDa i 63 kDa odpowiadających cząsteczce wydzielniczej (SC). Względna zawartość obydwu form SC była nieco zmieniona w próbach leukocytospermicznych w porównaniu do prób normozoospermicznych (praca nr 2).
4. Obserwowane w leukocytospermicznych plazmach nasienia obniżenie zawartości fukozy zarówno rdzeniowej, jak i wchodzącej w skład struktur cukrowych typu Lewis^x, obecnej na glikanach SC o masie cząsteczkowej 63 kDa, mogło umożliwić częściową degradację SC o masie cząsteczkowej 78 kDa do formy 63 kDa. W konsekwencji mogło to mieć wpływ na skuteczność SC w obronie przeciwko wewnętrznym infekcjom w obrębie męskiego układu rozrodczego (praca nr 2).
5. Specyficzna reaktywność (stosunek reaktywności z lektyną do zawartości białka) z MAA i SNA cząsteczki wydzielniczej o masie cząsteczkowej 63 kDa zarówno w grupie normozoospermicznej, jak i leukocytospermicznej, była wyższa niż formy SC o masie 78 kDa. Ta tendencja była wyraźniejsza w grupie normozoospermicznej niż w próbach leukocytospermicznych. Ponadto w grupie leukocytospermicznej zaobserwowano na SC o masie 78 kDa zwiększenie względnej zawartości kwasu sjałowego SNA-reaktywnego w porównaniu z grupą normozoospermiczną (praca nr 3).
6. Charakterystyczne cechy glikozylacji FN, AGP, IgG i SC plazmy nasienia mogą być wykorzystane do dokładniejszej charakterystyki niepłodności z towarzyszącą leukocytospermią oraz mogą stać się użytecznym narzędziem diagnostycznym do oceny niepłodności związanej z leukocytospermią z towarzyszącym stanem zapalnym. Mogą zatem być kolejnymi parametrami, których oznaczenie będzie pomocne przy wyborze odpowiedniej techniki wspomaganego rozrodu stosowanej u leukocytospermicznych pacjentów (prace nr 1, 2 i 3).

Kolejna z prezentowanych prac przedstawia wyniki badań mających na celu porównanie niektórych cech glikozylacji glikoprotein plazmy nasienia pochodzącej od płodnych i niepłodnych mężczyzn, a otrzymane wyniki pozwalają na sprecyzowanie następujących wniosków:

1. W ludzkiej plazmie nasienia można zaobserwować obecność i zmiany w ekspresji O-związanych glikanów. Reaktywność kwasu sjałowego z SNA była istotnie niższa w grupie astenozoospermicznej niż w obydwu grupach normozoospermicznych płodnych i niepłodnych mężczyzn. Ekspresja PHA-L-reaktywnych wielo-rozgałęzionych N-glikanów była znacząco niższa u oligozoospermicznych pacjentów niż w obydwu grupach normozoospermicznych (praca nr 4).
2. Wytypowanie w kolejnych badaniach modelowych białek, dla których analiza glikozylacji będzie relatywnie łatwa, i które będą najlepiej odzwierciedlały profil glikozylacji glikoprotein ludzkiej plazmy nasienia, pozwoli na ukazanie bardziej znaczących różnic pomiędzy badanymi próbami plazmy nasienia. Poszerzenie przez nas panelu używanych dotąd lektyn może mieć zastosowanie do dalszych badań nad glikozylacją glikoprotein plazmy nasienia (praca nr 4).

W dwóch następnych pracach przedstawiono wyniki badań mających na celu zbadanie zależności między stężeniami wybranych parametrów stresu oksydacyjnego (TAC i AOPP) a stężeniem enzymów proteolitycznych z grupy żelatynaz i ich tkankowych inhibitorów (praca nr 5) oraz stężeniem jednego ze znanych antyoksydantów – melatoniny (praca nr 6) w plazmach nasienia niepłodnych mężczyzn.

Celem przeprowadzonych badań była analiza dodatkowych parametrów mających związek z męskim potencjałem rozrodczym, które mogą być pomocne w dokładniejszej charakterystyce nasienia niepłodnych pacjentów przygotowywanych do sztucznego zapłodnienia metodą inseminacji i/lub zapłodnienia *in vitro*.

Analizując uzyskane wyniki można wyciągnąć następujące wnioski:

1. Wysokie stężenia AOPP wraz z podwyższonym stosunkiem MMP-9/TIMP-1 są wynikiem zmian w równowadze oksydacyjno-antyoksydacyjnej ejakulatu i mogą być pomocne w określaniu jakości nasienia i potencjału rozrodczego mężczyzn. Ekspresja żelatynaz oraz regulacja ich wydzielania przez endogenne inhibitory w powiązaniu z markerami równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej, mogą stanowić część szeregu mechanizmów regulujących męską płodność, również tych wpływających na liczbę plemników w ejakulacie (praca nr 5).
2. Proponowany przez nas zestaw sześciu parametrów (MMP 9 i 2, TIMP 1 i 2, TAC oraz AOPP) może być przydatny w różnicowaniu próbek w sposób odzwierciedlający ich cechy kliniczne i może okazać się pomocny w prognozowaniu skuteczności AI (praca nr 5).
3. W plazmach nasienia płodnych mężczyzn, wysokie stężenia melatoniny odpowiadają obniżonym stężeniom AOPP, natomiast w plazmach nasienia niepłodnych pacjentów azoospermicznych i teratoospermicznych, znaczne obniżenie wartości stężeń melatoniny korelowało z podwyższonymi wartościami stężeń AOPP. Dlatego też oznaczenia stężeń melatoniny i AOPP mogą dostarczyć dodatkowych informacji o jakości nasienia i męskim potencjale rozrodczym (praca nr 6).
4. Wyniki naszych badań sugerują, że oznaczanie stężenia melatoniny może być bardziej miarodajne niż TAC w określaniu zdolności antyoksydacyjnej ludzkiego nasienia. Chociaż stężenie melatoniny nie jest parametrem oznaczanym standardowo przy ocenie męskiej płodności, wydaje się, że jest ono lepszym i dokładniejszym niż TAC parametrem odzwierciedlającym właściwości antyoksydacyjne ludzkiego ejakulatu (praca nr 6).
5. U niepłodnych mężczyzn przygotowanych do sztucznego zapłodnienia metodą inseminacji, czy zapłodnienia *in vitro* warto też rozważyć możliwość ewentualnej suplementacji antyutleniaczami, z uwzględnieniem melatoniny, szczególnie biorąc pod uwagę dobór odpowiednich dawek (praca nr 5 i 6).

D. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych:

Prace oryginalne:

1. Kłósek A, Hirnle L, Zimmer M, Tomiałowicz M, Żmijewski J, Fuchs T, Woytoń J, **Kratz E**, Siut J: Stężenie fibronektyny w płynie owodniowym jako wykładnik nieuchronnego porodu. 2000, T.71 nr 4; s. 298-303, Ginekol. Pol. **Pkt. MNiSW/KBN: 5.000**

W tej pracy wykazano, że fibronektyna (FN) jest obecna w płynie owodniowym podczas ciąży i może być w nim identyfikowana w sposób ilościowy. Stężenia FN oznaczono w 86 płynach owodniowych pochodzących od ciężarnych kobiet (19 - 42 tydzień ciąży), metodą fazy stałej ELISA z zastosowaniem specyficznych przeciwciał monoklonalnych anty-ludzka FN. Wykazano istnienie korelacji między stężeniem fibronektyny w płynie owodniowym a czasem, jaki upłynie od momentu pobrania próby do porodu. Co najmniej dwukrotny wzrost wartości stężeń fibronektyny w płynie owodniowym w ciążach powikłanych zagrażającym przedwczesnym porodem, w porównaniu

do wyników otrzymanych dla ciąż niepowikłanych, świadczy o oddzielaniu się owodnio-kosmówki i wystąpieniu nieuchronnego porodu w czasie krótszym niż 24 godziny. Ponadto wykazano, że stężenie fibronektyny w płynie owodniowym nie jest zależne od okresu trwania ciąży fizjologicznej i odpływania płynu owodniowego.

Przedstawione poniżej trzy publikacje są wynikiem mojego pobytu na stażu naukowym w ramach projektu SOCRATES-ERASMUS, który odbyłam w Glycoimmunology Group, Department of Molecular Cell Biology, VU Medical Center, Van der Boechorststraat, BT Amsterdam, Holandia - kierownik: dr Willem van Dijk.

2. Poland DCW, **Kratz E**, Vermeiden J, De Groot SM, Bruyneel B, De Vries T, Van Dijk W: High level of α_1 - acid glycoprotein in human seminal plasma is associated with high branching and expression of Lewis(a) groups on its glycans: supporting evidence for a prostatic origin. 2002, Vol.52 no.1; s.34-42, Prostate. **IF: 3.151, Pkt. MNiSW/KBN: 13.000**

Wyniki badań przedstawionych w tej pracy częściowo wchodziły w skład mojej rozprawy doktorskiej. Wprawdzie zmiany w stężeniu α_1 -kwaśnej glikoproteiny (AGP) obecnej w plazmie nasienia były obserwowane wcześniej także przez innych badaczy, to źródło wysokich stężeń AGP, jak i typ jej glikozylacji nie zostały określone. Materiał badany stanowiły plazmy nasienia uzyskane od mężczyzn odwiedzających klinikę, w której wykonuje się sztuczne zapłodnienia (n = 47). Stężenie AGP oznaczono metodą immunodyfuzji radialnej. Analizę glikozylacji AGP wykonano metodą krzyżowej immunoelektroforezy powinowactwa oraz chromatograficznie metodą HPAEC-PAD z wykorzystaniem biotynyłowanej lektyny AAL (*Aleuria aurantia* agglutinin), a także w immunoblotingu ze specyficznymi przeciwciałami anty-Lewis^a. Wyniki przeprowadzonych badań pozwoliły na wykrycie dwóch typów fukozytacji glikanów AGP obecnej w plazmie nasienia ludzkiego: Lewis^x (AAL-reaktywne) i Lewis^a (reaktywne ze specyficznymi przeciwciałami). Struktury cukrowe typu Lewis^a były obecne tylko w plazmach nasienia o wysokich stężeniach AGP, natomiast nie były obecne w próbach o niskich stężeniach AGP. Wykazano, że obecność struktur Lewis^a jest związana ze zwiększonym stopniem rozgałęzienia glikanów i relatywnie zwiększoną aktywnością α 4-fukozylotransferazy. Wykazano także, że masa cząsteczkowa AGP plazmy nasienia jest nieco wyższa niż ta obserwowana dla osoczowej AGP (odpowiednio 47 i 41 - 43 kDa), a AGP plazmy nasienia posiada pięć N-związanych glikanów, analogicznie do osoczowej AGP. Otrzymane wyniki wskazują na to, że AGP plazmy nasienia najprawdopodobniej pochodzi z prostaty oraz, że jej glikany mogą być fukozyłowane zarówno w pozycji α 3, jak i α 4.

3. **Kratz E**, Poland DCW, Van Dijk W, Kątnik-Prastowska I: Alterations of branching and differential expression of sialic acid on alpha-1-acid glycoprotein in human seminal plasma. 2003, Vol.331 no.1-2; s.87-95, Clin. Chim. Acta. **IF: 1.633, Pkt. MNiSW/KBN: 10.000**

Przedstawione tutaj wyniki badań również częściowo uwzględniłam w swojej rozprawie doktorskiej. Część opisanych badań przeprowadziłam w Polsce w ramach realizacji grantu promotorskiego KBN (2002-2003; Nr 3 PO5A 070 23). W poprzedniej pracy wykazano, że stopień rozgałęzienia glikanów AGP obecnej w ludzkiej plazmie nasienia oraz typ ich fukozytacji są związane ze stężeniem AGP. Stężenie AGP oznaczono metodą immunodyfuzji radialnej. Analizę glikozylacji wykonano metodą krzyżowej immunoelektroforezy powinowactwa z wykorzystaniem biotynyłowanych lektyn ConA (*Concanavalin A*, analiza stopnia rozgałęzienia glikanów) oraz AAL (*Aleuria aurantia* agglutinin, analiza stopnia fukozytacji). W omawianej pracy zauważono związek

między stężeniem AGP w plazmach nasienia pochodzących od mężczyzn żyjących w bezpotomnych związkach (grupy: asteno-, azoo-, oligo-, terato-, astenoterato-, oligoterato- oraz oligoastenoteratozoospermiczna, wyodrębnione na podstawie wyników standardowej oceny nasienia, n = 61) oraz w plazmach nasienia pochodzących od płodnych mężczyzn (n = 10), a zmianami w stopniu rozgałęzienia i typie sjalilacji glikanów AGP (przedział wiekowy badanych mężczyzn: 20 - 45 lat). Nie stwierdzono natomiast istotnych różnic w stopniu rozgałęzienia glikanów AGP oraz w stopniu sjalilacji AGP plazmy nasienia w odniesieniu do wyników standardowej oceny nasienia. Obserwowane zmiany w stopniu glikozylacji AGP mogą wpływać na przebieg procesów zależnych od glikozylacji, takich jak oddziaływanie plemnik – ostonka przejrzysta komórki jajowej oraz aktywacja dopełniacza, tym samym przyczyniając się do powstawania niepłodności. Obecność w plazmie nasienia wysokich stężeń AGP o zmienionej glikozylacji może wskazywać na przewlekły stan zapalny w obrębie męskiego układu rozrodczego, co może być wykorzystane jako dodatkowy parametr pozwalający na bardziej precyzyjną charakterystykę nasienia mężczyzn żyjących w bezpotomnych związkach. Badania nad glikozylacją AGP obecnej w ludzkiej plazmie nasienia, kontynuowałam w dalszych latach, a ich wyniki omówiłam w moim głównym osiągnięciu naukowym (praca nr 1).

4. de Soet JJ, Schriks MCM, Kratz E, Poland DCW, Van Dijk W, Van Amerongen WE: Dental caries related to plasma IgG and alpha(1)-acid glycoprotein. 2003, Vol.37 no.2; s.79-84, Caries Res. IF: 1.486, Pkt. MNiSW/KBN: 9.000

Przeprowadzone badania miały na celu ustalenie, czy próchnica zębów wiąże się z indukcją układowej odpowiedzi układu odpornościowego lub cytokin. Poddano badaniom klinicznym 85 dzieci (w wieku 6 - 7 lat) z Den Pasar, Bali i Indonezji, a także oznaczono w osoczu krwi stężenia następujących białek: α_1 -kwaśnej glikoproteiny (metodą immunoelektroforezy rakietowej), całkowitej immunoglobuliny G (IgG) oraz immunoglobuliny M i IgG specyficznej wobec *Streptococcus mutant* (immunoenzymatycznym testem fazy stałej ELISA). Otrzymane wyniki sugerują, że zaawansowana próchnica może wpływać na wartości parametrów charakterystycznych dla występowania układowego stanu zapalnego, a przez to mieć konsekwencje dla ogólnego stanu zdrowia pacjenta.

Kolejne prace naukowe stanowią kontynuację badań mających na celu wytypowanie i charakterystykę parametrów biochemicznych, które mogą stać się pomocne w dokładniejszej diagnostyce męskiej niepłodności.

5. Kratz E, Pupek M, Chełmońska-Soyta A, Kątnik-Prastowska MI: Formy molekularne immunoglobuliny A w plazmie nasienia ludzkiego. 2004, Vol.13 no.4; s.541-547, Adv. Clin. Exp. Med. Pkt. MNiSW/KBN: 5.000

Wydzielnicza immunoglobulina A (S-IgA) stanowi pierwszą linię immunologicznej obrony na powierzchni błon śluzowych dróg moczowo-płciowych przeciw patogenom oraz wydzielanym przez nie toksynom. W plazmie nasienia ludzkiego obok S-IgA i IgA, jest obecna także wolna cząsteczka wydzielnicza (SC). Ejakulatory pochodziły od mężczyzn w wieku 20 - 45 lat pozostających w bezpotomnych związkach (n = 61). Na podstawie wyników standardowego badania nasienia wyodrębniono grupy: normo-, asteno-, azoo-, oligo-, terato-, astenoterato-, oligoterato- oraz oligoastenoteratozoospermiczną. Stężenia form molekularnych IgA (monomer IgA, S-IgA, IgA1) oznaczono metodą immunoenzymatyczną fazy stałej (ELISA). Rozkład pasm odpowiadających formom molekularnym S-IgA sprawdzono w immunoblotingu, stosując swoiste przeciwciała monoklonalne anty-ludzka SC (IgA). W pracy tej wykazano, że wartości stężeń IgA, S-IgA i IgA1 oraz procentowe

udziały poszczególnych form molekularnych IgA, a także obecność wolnej cząsteczki wydzielniczej w plazmach nasienia ludzkiego, są niezależne od wyników standardowej oceny nasienia. Dodatkowo stwierdzono, że w plazmie nasienia ludzkiego, obok natywnej formy S-IgA, są obecne produkty jej degradacji, których skład pod względem ilościowym i jakościowym wydaje się związany z parametrami charakteryzującymi plemniki. Wyraźnie mniejszą liczbę produktów degradacji S-IgA obserwowano w plazmie nasienia mężczyzny z udowodnioną płodnością, w porównaniu do liczby pasm występujących u pacjentów żyjących w bezpotomnych związkach. Analiza stężeń form molekularnych IgA oraz identyfikacja frakcji S-IgA reagujących ze swoistym przeciwciałem monoklonalnym mogą stanowić wstęp do oznaczeń mających na celu dalsze ukierunkowanie diagnostyki męskiej niepłodności. Badania dotyczące analizy SC obecnej w ludzkiej plazmie nasienia były kontynuowane, a ich wyniki przedstawiłam w dwóch pracach uwzględnionych w moim głównym osiągnięciu naukowym (prace nr 2 i 3 cyklu).

6. Kątnik-Prastowska I, **Kratz E**, Faundez R, Chełmońska-Soyta A: Lower expression of the α 2,3-sialylated fibronectin glycoform and appearance of the asialo-fibronectin glycoform are associated with high concentrations of fibronectin in human seminal plasma with abnormal semen parameters. 2006, Vol.44 no.9; s.1119-1125, Clin. Chem. Lab. Med. **IF: 1.725, Pkt. MNiSW/KBN: 20.000**

Celem tej pracy było porównanie ekspresji α 2,3- i/lub α 2,6 przyłączonego kwasu sjałowego wchodzącego w skład glikanów fibronektyny (FN) obecnej w plazmie nasienia mężczyzn żyjących w bezpotomnych związkach (grupy: asteno-, oligo-, terato-, astenoterato-, oligoterato- i oligoastenoteratozoospermiczna; n = 61). Analizę stopnia sjałilacji FN wykonano metodą fazy stałej lektyno-ELISA z wykorzystaniem sjało-specyficznych lektyn, odpowiednio: MAA (*Mackia amurensis* agglutinin) i SNA (*Sambucus nigra* agglutinin). Uzyskane wyniki analizowano w odniesieniu do parametrów nasienia, a także do stężenia fibronektyny oznaczonego immunoenzymatycznym testem fazy stałej ELISA. Wykazano, że wysokie stężenia fibronektyny korelują z nieprawidłowymi parametrami nasienia. Glikany fibronektyny pochodzącej z plazmy nasienia, w przeciwieństwie do fibronektyny osocza, częściej zawierają kwas sjałowy przyłączony wiązaniem α 2,3 niż α 2,6. Względna zawartość obydwu kwasów sjałowych wchodzących w skład glikanów fibronektyny była niższa w plazmach nasienia mężczyzn podejrzanych o niepłodność. Wykazano, że fibronektyna obecna w nasieniu ma nowotworowo-płodowy typ usjałowania, a dystrybucja hipo- i asjało-glikoform fibronektyny jest związana z nieprawidłowymi parametrami nasienia i wysokimi stężeniami fibronektyny. Kontynuację prac badawczych nad glikozylacją FN ludzkiej plazmy nasienia, stanowiły badania omówione w moim głównym osiągnięciu naukowym (praca nr 1).

Do kolejnych moich osiągnięć naukowo-badawczych można zaliczyć publikację, w której przedstawiono wyniki badań realizowanych pod moim kierunkiem w ramach badań własnych uczelni w Katedrze i Zakładzie Chemii i Immunochemii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu (projekt badawczy nr 1606). Praca ta dotyczy zmian glikozylacji immunoglobuliny G obecnej w płynie stawowym w różnych stadiach zaawansowania reumatoidalnego zapalenia stawów.

7. **Kratz EM**, Borysewicz K, Kątnik-Prastowska I: Terminal monosaccharide screening of synovial immunoglobulins G and A for the early detection of rheumatoid arthritis. 2010, Vol.30 no.10; s.1285-1292, Rheumatol. Int. **IF: 1.431, Pkt. MNiSW/KBN: 20.000**

W tym artykule przedstawiono wyniki analizy ekspresji niektórych końcowych glikotopów immunoglobulin G, A i M obecnych w płynach stawowych, w odniesieniu do stopnia zaawansowania reumatoidalnego zapalenia stawów (RZS) określonego na podstawie wczesnych i zaawansowanych zmian radiologicznych w dłoni pacjenta (wiek 22 – 72 lata; n = 38). W zidentyfikowanych na podstawie immunoblotingu pasmach immunoglobulin, oznaczono względną zawartość końcowych monosacharydów za pomocą lektyno-blotingu z zastosowaniem odpowiednich lektyn: rozpoznających kwas sialowy przyłączony wiązaniem $\alpha 2,6$ (*Sambucus nigra* agglutinin) i $\alpha 2,3$ (*Maackia amurensis* agglutinin), galaktozę (*Ricinus communis* agglutinin I), N-acetyloglukozaminę (*Griffonia simplicifolia* agglutinin II), jak również fukozę przyłączoną wiązaniem $\alpha 1,6$ (*Aleuria aurantia* lectin), $\alpha 1,3$ (*Lotus tetragonolobus* agglutinin) i $\alpha 1,2$ (*Ulex europaeus* agglutinin). Otrzymane wyniki pozwoliły na wykazanie różnic między wczesnym i zaawansowanym stadium RZS w ekspozycji końcowych monosacharydów na glikanach IgG i IgA płynu stawowego, ale nie IgM. Glikotopy pozbawione galaktozy, z odsłoniętą resztą N-acetyloglukozaminy, obecne były na 33,1-kDa fragmencie IgG wyłącznie we wczesnym stadium rozwoju RZS. W przeciwieństwie do tego, glikotop ten był obecny na natywnej IgG i IgA w obydwu grupach badanych, jakkolwiek jego ekspresja była wyższa w zaawansowanym stadium RZS. Ekspresja sjalowanych i fukozylowanych glikanów na natywnej IgG i IgA była znacznie niższa we wczesnym stadium choroby, niż w jej stadium zaawansowanym. Wynik analizy ekspresji końcowych monosacharydów zarówno na natywnej IgG, IgA, jak i na fragmentach IgG obecnych w płynie stawowym, może stać się pomocny w wytypowaniu parametru charakterystycznego dla stadium zaawansowania RZS, przydatnego zarówno w diagnostyce, jak i ukierunkowującego leczenie pacjentów cierpiących na RZS.

Innym aspektem moich badań była analiza glikozylacji dwóch białek ostrej fazy, haptoglobiny i α_1 -kwaśnej glikoproteiny, obecnych w surowicach pochodzących od pacjentów chorych na raka płuc, a uzyskane wyniki przedstawiono w poniższej pracy.

8. Ferens-Sieczkowska M, **Kratz EM**, Kossowska B, Passowicz-Muszyńska E, Jankowska R: Comparison of haptoglobin and alpha1-acid glycoprotein glycosylation in the sera of small cell and non-small cell lung cancer patients. 2013, Vol.67; s.828-836, Post. Hig. Med. Dośw. (online). **IF: 0.633, Pkt. MNiSW/KBN: 15.000**

Epitopy cukrowe związane z rozwojem nowotworu, wytypowane jako potencjalne markery diagnostyczne i prognostyczne, wykryto na głównych białkach ostrej fazy. Jednakże nie jest całkowicie jasne, czy profil glikozylacji jest podobny dla różnych glikoprotein, czy też jest w pewnym stopniu charakterystyczny dla danego białka. Dlatego też poszukując markerów glikozylacji należy zwrócić uwagę nie tylko na cechy strukturalne oligosacharydu, ale także zidentyfikować białko, które jest efektywnym nośnikiem zmienionych glikanów. Analizę glikozylacji wykonano metodą lektyno-ELISA z wykorzystaniem biotynylowanych lektyn: MAA (*Maackia amurensis* agglutinin, rozpoznaje kwas sialowy przyłączony wiązaniem $\alpha 2,3$) oraz fukozo-specyficznej lektyny AAL (*Aleuria aurantia* agglutinin) oraz testem ELISA z przeciwciałami anty-sjalo-Lewis^x. Celem pracy było porównanie całościowej fukozytacji, $\alpha 2,3$ sjalilacji oraz ekspresji epitopów sjalo-Lewis^x w surowicach oraz glikozylacji AGP i haptoglobiny u pacjentów z rakiem drobnokomórkowym (n = 13) i niedrobnokomórkowym (n = 23) w porównaniu do osób zdrowych, jak również zbadanie zależności pomiędzy zmianami w glikozylacji a stopniem zaawansowania nowotworu i jego typem histologicznym. Typowe białka ostrej fazy, haptoglobina i AGP, wykazują odmienne profile glikozylacji

w raku płuca. Wykazano, że zmiany obserwowane na haptoglobinie odzwierciedlają przebieg procesu chorobowego lepiej niż te obserwowane na AGP.

Moje badania dotyczyły także analizy glikozylacji glikoprotein obecnych w ślinie osób uzależnionych od alkoholu, a ich wyniki przedstawiono w artykule omówionym poniżej.

9. **Kratz EM**, Waszkiewicz N, Kałuża A, Szajda SD, Zalewska-Szajda B, Szulc A, Zwierz K, Ferens-Sieczkowska M: Glycosylation changes in the salivary glycoproteins of alcohol-dependent patients: a pilot study. 2014, Vol.49 no.1; s.23-30, Alcohol Alcohol. **IF: 2.092, Pkt. MNiSW/KBN: 35.000**

Długotrwałe nadużywanie alkoholu ma wpływ na glikozylację białek surowicy. Nasze badania skupiały się na zmianach w strukturach glikanowych glikoprotein obecnych w ślinie alkoholików, wskazując najbardziej efektywne nośniki takich glikoepitopów. Analizę glikozylacji glikoprotein obecnych w ślinach 31 pacjentów uzależnionych od alkoholu i 21 zdrowych, wykonano za pomocą testu lektyno-ELISA i lektyno-blotingu z lektynami specyficznymi dla rdzeniowej (AAL) i antenowej (LTA, UEA) fukozy, α 2,3 przyłączonego kwasu sialowego (MAA) oraz antygenów T i Tn O-glikanów (odpowiednio: APA i VVL). W bezpośrednim teście lektyno-ELISA wykazano, że fukozyllacja rdzeniowa, α 2,3 sialylacja i ekspresja antygenu T były znacząco obniżone w ślinie pacjentów uzależnionych od alkoholu. W lektyno-blotingu analizowano dziesięć pasm odpowiadających glikoproteinom. Profil zmian chorobowych okazał się złożony, lecz za pomocą wszystkich sześciu użytych lektyn można było wykryć zmienione struktury glikanów. Dla niektórych glikoprotein obserwowano tendencję do poprawienia profilu glikozylacji po 7 tygodniach abstynencji. Niektóre z glikoprotein śliny, takie jak α -amylaza, klasteryna, haptoglobina, ciężkie i lekkie łańcuchy immunoglobulin i transferyna, wydaje się, że są warte szczegółowej analizy glikozylacji w kontekście wykrywania uzależnienia od alkoholu. Dalsze badania mogą pozwolić na oszacowanie, czy takie glikomarkery mogą również odzwierciedlać ilość spożywanego alkoholu lub czas trwania uzależnienia od alkoholu.

Chociaż moje badania dotyczyły analizy ekspresji i/lub glikozylacji glikoprotein obecnych w różnych płynach biologicznych w różnych stanach chorobowych, to najważniejszym kierunkiem prowadzonych przeze mnie badań pozostaje poszukiwanie biomarkerów obecnych w płazmie nasienia ludzkiego (w tym także glikomarkerów), których oznaczenie mogłoby mieć implikacje diagnostyczne, przyczyniając się tym samym do lepszej charakterystyki ejakulatu mężczyzn przygotowywanych do sztucznego zapłodnienia metodą inseminacji lub technik *in vitro*. Wyniki badań przedstawione w poniższych pracach stanowią kolejny krok na tej drodze.

10. **Kratz EM**, Wójtowicz M, Przybysz M, Faundez R, Kątnik-Prastowska I. Human seminal fibronectin fragmentation patterns and their domain immunoreactivities in leucocytospermic patients. 2014 Aug;26(7):1044-51. *Reprod. Fertil. Dev.* doi: 10.1071/RD13049. **IF: 2.577, Pkt. MNiSW/KBN: 25.000**

Celem tej pracy było zbadanie immunoreaktywności domen fibronektyny (FN) i profilu jej fragmentacji w płazmie nasienia mężczyzn płodnych normozoospermicznych i nieplodnych leukocytospermicznych. Wykorzystując domeno-specyficzne przeciwciała monoklonalne oznaczono stężenia domen FN immunoenzymatyczną metodą fazy stałej ELISA, natomiast immunoblotingu posłużył do określenia profilu fragmentacji FN. W immunoblotingu zarówno w normozoospermicznych, jak i w leukocytospermicznych płazmach nasienia wykazano obecność dwunastu pasm FN odpowiadających masom cząsteczkowym w zakresie 70 - 196 kDa, a obserwowany profil fragmentacji FN był prawie identyczny w warunkach redukujących, jak

i nieredukujących. Zaobserwowano w immunoblotingu, że epitopy domen FN, takich jak wiążącej komórki, fibrynę, kolagen oraz domeny dodatkowej A (ang. extra domain A, EDA), wykazywały reaktywność ze specyficznymi wobec nich przeciwciałami monoklonalnymi. Natomiast brak reaktywności z przeciwciałami swoistymi wobec domeny wiążącej fibrynę i heparynę (N-koniec) oraz regionu w pobliżu mostków dwusiarczkowych (C-koniec) polipeptydu FN może sugerować, że domeny te zostały zdegradowane podczas procesu upłynnienia nasienia. Nie wykazano istotnych różnic między grupą normozoospermiczną a leukocytospermiczną w stężeniach domen FN wiążącej komórki, fibrynę i kolagen oraz we względnej zawartości EDA. Obserwowane wysokie wartości odchyłeń standardowych dla immunoreaktywności domen FN w grupie leukocytospermicznych plazm nasienia prawdopodobnie wynikają z różnej etiologii leukocytospermii, niekoniecznie spowodowanej istniejącym stanem zapalnym. Profil fragmentacji FN w plazmie nasienia może odzwierciedlać aktywność enzymów proteolitycznych w procesie upłynnienia nasienia, a analiza statusu molekularnego FN obecnej w ejakulacie może być pomocna przy wyborze nasienia o najwyższej jakości w technikach wspomaganego rozrodu. Omówienie innych parametrów biochemicznych oznaczanych przez nas w leukocytospermicznych plazmach nasienia przedstawiono w pracach nr 1, 2 i 3 cyklu.

11. Olejnik B, Kratz EM, Zimmer M, Ferens-Sieczkowska M. Glycoprotein fucosylation is increased in seminal plasma of subfertile men. 2014, Sep 16, Asian J. Androl. doi: 10.4103/1008-682X.138187. [Epub ahead of print] IF: 2.530, Pkt. MNiSW/KBN: 35.000 (2014)

Fukoza jest monosacharydem obecnym zarówno na N-, jak i O-glikanach. Wchodzi także w skład antygenów cukrowych typu Lewis, uczestniczących w bezpośrednim wiązaniu się plemnika z osłonką przejrzystą komórki jajowej. Tego typu interakcje mogą być hamowane *in vitro* przez oligo- i polisacharydy zawierające fukozę, jak również przez neoglikoproteiny, a w warunkach *in vivo* mogą zaburzać normalny przebieg kaskady zapłodnienia. Opisane tutaj badania miały na celu analizę jakościową i ilościową białek ludzkiej plazmy nasienia pochodzącej od mężczyzn niepełnych przygotowywanych to inseminacji (n = 126) oraz zawartości fukozylowanych glikoepitopów i porównanie ich z próbkami pochodzącymi od normozoospermicznych, płodnych mężczyzn (n = 12). Białka plazmy nasienia rozdzielono elektroforetycznie w żelu poliakrylamidowym i poddano lektynoblotingowi z wykorzystaniem fukozy-specyficznej lektyny z *Aleuria aurantia*. Do ilościowej analizy densytometrycznej wybrano 12 pasm. Wykazano, że zarówno liczba obserwowanych pasm, jak i gęstość optyczna fukozylowanych glikanów, były wyższe w glikoproteinach obecnych w plazmach nasienia pochodzących od mężczyzn o obniżonej płodności. Nie było wyraźnych różnic w fukozytacji w grupach normo-, oligo-, asteno- i oligoastenozoospermicznej o obniżonej płodności. Immunobloting z wykorzystaniem przeciwciał specyficznych wobec wybranych białek plazmy nasienia pozwolił na wykazanie, że AAL-reaktywne pasma białkowe odpowiadały typowym glikoproteinom obecnym w męskich drogach rozrodczych, takim jak antygen specyficzny dla prostaty, kwaśna fosfataza prostaty, glikodelina i gonadotropina kosmówkowa. Fibronektyna, α_1 -kwaśna glikoproteina, α_1 -antytrypsyna, immunoglobulina G i antytrombina III mogą także zawierać znaczne ilości fukozy. Sugeruje się, że liczne fukozylowane glikany obecne w plazmie nasienia mogą oddziaływać z powierzchnią plemników i zakłócać prawidłowy przebieg kaskady zapłodnienia.

Prace poglądowe:

1. **Kratz E**, Klósek A, Kątnik-Prastowska I: Fibronektyna nowotworowo-płodowa. 2000, Vol.9 no.4; s.377-382, Adv. Clin. Exp. Med. **Pkt. MNiSW/KBN: 3.000**

W pracy omówiono zarówno molekularną strukturę fibronektyny, jak i budowę i rolę epitopu nowotworowo-płodowego wchodzącego w skład jej struktury, a także przedyskutowano znaczenie oznaczania stężenia fibronektyny w ginekologii i położnictwie.

2. **Kratz E**, Achcińska MK: Mechanizmy molekularne w procesie zapłodnienia: rola czynnika męskiego. 2011, Vol.65; s.784-795, Post. Hig. Med. Dośw.(online). **IF: 0.654, Pkt. MNiSW/KBN: 9.000**

Praca ta miała na celu przybliżenie czytelnikowi wybranych mechanizmów molekularnych zachodzących w obrębie męskich narządów rozrodczych związanych z procesem zapłodnienia, na każdym z etapów tego procesu, a także prześledzenia ich wpływu na męską płodność.

3. Ferens-Sieczkowska M, Kowalska B, **Kratz EM**: Seminal plasma glycoproteins in male infertility and prostate diseases: is there a chance for glyco-biomarkers? 2013, Vol.18 no.1; s.10-22, Biomarkers. **IF: 2.522, Pkt. MNiSW/KBN: 25.000**

Zaburzenia w interakcjach białko - węglowodany mogą leżeć u podstaw mechanizmów molekularnych niektórych chorób męskiego układu rozrodczego, w tym niepłodności i chorób prostaty. W tej pracy przedstawiono aktualny stan wiedzy na temat profilu glikozylacji glikodeliny-S, fibronektyny, antygeny specyficznego dla prostaty i α_1 -kwaśnej glikoproteiny. Na glikoproteinach ludzkiej plazmy nasienia obecne są niektóre rzadkie glikoepitopy: glikany wysokomannozowe i polilaktozaminowe oraz N-glikany zawierające N-acetylogalaktozaminę. Profil glikozylacji ulega zmianom w stanach patologicznych. Dalsze szczegółowe badania mogą prowadzić do wskazania biomarkerów użytecznych w leczeniu zaburzeń w funkcjonowaniu męskiego układu rozrodczego.

Sumaryczny IF: 20.434

Suma pkt. MNiSW/KBN: 229

PEŁNY DOROBEK NAUKOWY OBEJMUJE:

DOROBEK NAUKOWY SPRZED UZYSKANIA STOPNIA DOKTORA NAUK MEDYCZNYCH	<i>n</i>	Współczynnik wpływu (<i>IF</i>)	Punktacja MNiSW
PUBLIKACJE NAUKOWE	5	6.27	40
Prace oryginalne (łącznie)	4	6.27	37
• autor korespondencyjny i/lub pierwszy autor	1		
• współautor	3		
Prace poglądowe (łącznie)	1		3
• autor korespondencyjny i/lub pierwszy autor	1		
• współautor	-		
DONIESIENIA KONFERENCYJNE	7		
Międzynarodowe	3		
Krajowe	4		
DOROBEK NAUKOWY PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA NAUK MEDYCZNYCH	<i>n</i>	Współczynnik wpływu (<i>IF</i>)	Punktacja MNiSW
PUBLIKACJE NAUKOWE	15	26.254	336
Prace oryginalne* (łącznie)	13	23.078	302
• autor korespondencyjny i/lub pierwszy autor	10		
• współautor	3		
Prace poglądowe (łącznie)	2	3.176	34
• autor korespondencyjny i/lub pierwszy autor	1		
• współautor	1		
Prace wskazane jako znaczące osiągnięcie (łącznie)	6	12.09	147
<i>Zgodnie z art. 16 ust. 2 z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z późn. zm.)</i>			
• autor korespondencyjny i/lub pierwszy autor	6	12.09	147
• współautor	-		
DONIESIENIA KONFERENCYJNE	14		
Międzynarodowe	12		
Krajowe	2		
Publikacje pełnotekstowe łącznie	20	32.524	376
ROZDZIAŁY W MONOGRAFIACH, PODRĘCZNIKACH I SKRYPTACH ORAZ PEŁNOTEKSTOWE REFERATY W MATERIAŁACH ZJAZDOWYCH	8		33
• w języku polskim	4		9
• w języku angielskim	4		24

* w tym prace wskazane jako znaczące osiągnięcie

n – liczba prac

***RAPORT CYTOWAŃ WG DANYCH WEB OF SCIENCE
z dnia 04.05.2015**

Liczba cytowań	72
Liczba cytowań bez autocytowań	49
h-index	6

Web of Science™ | InCites™ | Journal Citation Reports® | Essential Science Indicators™ | EndNote™ | Sign In | Help | English

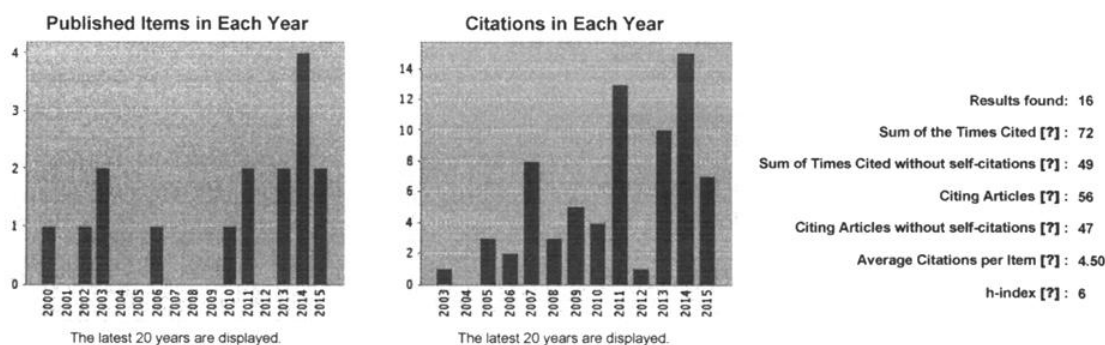
WEB OF SCIENCE™

Search Return to Search Results My Tools Search History Marked List 16

Citation Report: 16
(from All Databases)

You searched for: **From Marked List: ...More**
Timespan: All years.
...Less

This report reflects citations to source items indexed within All Databases.



*Powyższe zestawienie przygotowano uwzględniając cytowania dostępne we wszystkich bazach danych.

V. DOROBEK DYDAKTYCZNY I POPULARYZATORSKI ORAZ INFORMACJA O WSPÓŁPRACY KRAJOWEJ I MIĘDZYNARODOWEJ

a) Uczestnictwo w programach europejskich oraz innych programach międzynarodowych i krajowych:

- Uczestnictwo (10 miesięcy; 01.03.-31.12.2011) w projekcie współfinansowanym przez Unię Europejską i Budżet Państwa w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego: „Program rozwoju Akademii Medycznej we Wrocławiu”, w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, Działanie 4.1.1., „Wzmocnienie i rozwój potencjału dydaktycznego Uczelni oraz zwiększenie liczby absolwentów kierunków o kluczowym znaczeniu dla gospodarki opartej na wiedzy” realizowany pod nadzorem Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Umowa nr D-12-S/PD-SN/2011.
- Uczestnictwo (3 miesiące; 15.02.-15.05.2001) w programie SOCRATES-ERASMUS, stypendium i staż naukowy w Department of Molecular Cell Biology, Glycoimmunology Group, Vrije Universiteit Medical Center, Amsterdam, Holandia.

b) Udział w międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych:**Udział czynny w 21 konferencjach (15 międzynarodowych i 6 krajowych):**

1. **E. Kratz**, A. Piwowar, M. Zeman, K. Stebelova, T. Thalhammer: Oxidative stress parameters and melatonin in seminal plasma of infertile men. W:The 2nd Biomarker Meeting in Personalized Reproductive Medicine "Biomarkers for the assessment of ovarian reserve, gametes, embryos, endometrium and pregnancy in health and disease". Valencia, Spain, April 10-12, 2014. Program [& abstracts]; s.P-5.
2. **E. Kratz**, A. Kałuża, M. Zimmer, M. Ferens-Sieczkowska: The analysis of sialylation and expression of o-glycans in seminal plasma of infertile men. W:The 2nd Biomarker Meeting in Personalized Reproductive Medicine "Biomarkers for the assessment of ovarian reserve, gametes, embryos, endometrium and pregnancy in health and disease". Valencia, Spain, April 10-12, 2014. Program [& abstracts]; s.P-5.
3. B. Olejnik, **E. Kratz**, M. Zimmer, M. Ferens-Sieczkowska: Screening of seminal plasma glycoproteins in subfertile men for unique high-mannose-type glycans. W:The 2nd Biomarker Meeting in Personalized Reproductive Medicine "Biomarkers for the assessment of ovarian reserve, gametes, embryos, endometrium and pregnancy in health and disease". Valencia, Spain, April 10-12, 2014. Program [& abstracts]; s.P-4.
4. **E.M. Kratz**, M. Ferens-Sieczkowska, M. Zimmer, A. Piwowar: Oxidative protein damage and oxidative stress markers in the seminal plasma of subfertile men. J.Reproduktionsmed.Endokrinol. 2012 Vol.9 no.5; s.386-387 poz.P77, 7th European Congress of Andrology (ECA). Berlin, November 28 - December 1, 2012. Abstracts.
5. **E.M. Kratz**, A. Kałuża, B. Kowalska-Olejnik, M. Zimmer, R. Fiutek, M. Ferens-Sieczkowska: The expression of metalloproteinases 9 and 2, and their tissue inhibitors 1 and 2 as a potential markers of asthenozoospermia. J.Reproduktionsmed.Endokrinol. 2012 Vol.9 no.5; s.385-386 poz.P74, 7th European Congress of Andrology (ECA). Berlin, November 28 - December 1, 2012. Abstracts.
6. **E.M. Kratz**, K. Kolaszt, R. Faundez, M. Ferens-Sieczkowska: The analysis of secretory immunoglobulin A in human seminal plasma. W:Molecular and physiological aspects of regulatory processes of the organism; ed. by Henryk Lach ; Józef Dietl Malopolska Higher School in Cracow; Cracow : Wydaw. Abaton, 2012; s.177-179, ISBN 978-83-61569-52-7, 21th International Symposium of Polish Network of Molecular and Cellular Biology. Cracow, Poland, 14-15 June 2012.
7. **E.M. Kratz**, M.K. Achcińska, R. Faundez, M. Ferens-Sieczkowska: The fucosylation of immunoglobulin G in human seminal plasma. W:Molecular and physiological aspects of regulatory processes of the organism ; ed. by Henryk Lach ; Józef Dietl Malopolska Higher School in Cracow; Cracow : Wydaw. Abaton, 2012; s.180-182, ISBN 978-83-61569-52-7, 21th International Symposium of Polish Network of Molecular and Cellular Biology. Cracow, Poland, 14-15 June 2012.
8. B. Kowalska, **E. Kratz**, M. Ferens-Sieczkowska: Expression of AAL- and UEA-reactive fucose in the oligosaccharides of seminal plasma glycoproteins of subfertile men. W:Molecular and physiological aspects of regulatory processes of the organism ; ed. by Henryk Lach ; Józef Dietl Malopolska Higher School in Cracow; Cracow : Wydaw. Abaton, 2012; s.172-174, ISBN

- 978-83-61569-52-7, 21th International Symposium of Polish Network of Molecular and Cellular Biology. Cracow, Poland, 14-15 June 2012.
9. M. Przybysz, M. Pupek, **E. Kratz**, I. Kątnik-Prastowska: Fucosylation of human fibronectin in health and diseases. *Acta Biochim.Pol.* 2010 Vol.57 suppl.4; s.180 poz.L11.5, 45th Meeting of the Polish Biochemical Society. Wisła, Poland, September 20th-23rd, 2010. Abstracts.
 10. M. Murawski, **E. Kratz**, M. Gryboś, I. Kątnik-Prastowska: Evaluation of selenium influence on selected human semen quality parameters and the acrosome reaction. W:Reproductive medicine and beyond: the 3rd International IVI Congress. Madrid (Spain), May 14-16, 2009. Program and abstracts; s.99.
 11. K. Borysewicz, **E. Kratz**, M. Przybysz: Sialylation of synovial glycoproteins as a markers associated with early rheumatoid arthritis. *Ann.Rheum.Dis.* 2008 Vol.67 suppl.2; s.145 poz.THU0027, EULAR 2008 - Annual European Congress of Rheumatology. Paris (France), 11-14 June 2008. Abstracts.
 12. **E. Kratz**, K. Borysewicz, I. Kątnik-Prastowska: Glycosylation of main synovial immunoglobulin isotypes in different stages of rheumatoid arthritis. W:17th International Symposium "Molecular and physiological aspects of regulatory processes of the organism". Cracow, 5-6 June 2008; s.238-239.
 13. **E. Kratz**, K. Borysewicz, H. Krotkiewski, I. Kątnik-Prastowska: Expression of IgG glycoforms in different stages of rheumatoid arthritis. W:2nd European Conference on Chemistry for Life Sciences. Wrocław, Poland, 4-8 September 2007; s.220 poz.106.
 14. **E. Kratz**, M. Pupek: Immunoglobulin A and secretory immunoglobulin A in human seminal plasma. *Immunol.Lett.* 2003 Vol.87 no.1-3; s.289 poz.W31.14, 15th European Immunology Congress - EFIS 2003. Rhodes Island (Greece), June 8-12, 2003.
 15. **E. Kratz**, A. Chełmońska-Soyta, I. Kątnik-Prastowska: Sialylation of human seminal plasma fibronectin in relation to sperm analysis. W:6th Jenner Glycobiology and Medicine Symposium . 14-17 september 2002. Seillac (France); [2s.nlb.].
 16. **E. Kratz**, M. Pupek, I. Kątnik-Prastowska: Immunoglobulina A w plazmie nasienia ludzkiego. W:XXXVIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Wrocław, 18-22 września 2002 roku. Streszczenia; s.355-356, poz. X-P-36.
 17. **E. Kratz**, D.C.W. Poland, I. Kątnik-Prastowska, W. Van Dijk: Glycosylation of α -1-acid glycoprotein in human seminal plasma. *Glycoconjugate J.* 2001 Vol.18 no.1-2; s.57 poz.C8.7, XVI International Symposium on Glycoconjugates. The Hague (The Netherlands), August 19-24, 2001. Abstracts.
 18. I. Kątnik-Prastowska, **E. Kratz**, A. Chełmońska-Soyta: Analiza uszalenia fibronektyny obecnej w plazmie nasienia męskiego. W:XXXVII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Toruń 10-14 września 2001r. Streszczenia; s.197 poz.K-10-14.
 19. **E. Kratz**, E. Moneta, A. Chełmońska-Soyta, I. Kątnik-Prastowska: Mikroheterogenność alfa1-kwaśnej glikoproteiny pochodzącej z plazmy nasienia. W:Streszczenia XXXVI Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Poznań, 11-14 września 2000; Poznań : Bogucki Wydawnictwo Naukowe S.C., 2000; s.348 poz.P12-97.

Udział czynny w konferencjach bez opublikowanych streszczeń:

1. B. Kowalska, **E.M. Kratz**: Styl życia a bezpłodność męska. IV Ogólnopolska Konferencja Naukowo-Szkoleniowa oraz II Ogólnopolska Studencka Konferencja Naukowo Szkoleniowa pt. „Promocja Zdrowia, Profilaktyka i Opieka w Chorobach Przewlekłych na Poziomie Podstawowej Opieki Zdrowotnej-Współczesne Problemy”. Wydział Nauk o Zdrowiu Akademii Medycznej we Wrocławiu. 4-5 listopada 2011.
2. A. Kłósek, L. Hirnle, M. Zimmer, M. Tomiałowicz, J. Żmijewski, T. Fuchs, J. Woytoń, **E. Kratz**, J. Siut: Stężenie fibronektyny w płynie owodniowym jako wykładnik nieuchronnego porodu. Ogólnopolskie Sympozjum "Poród końca XX wieku". Wrocław-Polanica Zdrój, 7-8 kwietnia 2000 r.

Udział bierny w konferencjach, szkoleniach, seminariach:

- 2014** – szkolenie pt.: „Tryb, zasady i kryteria nadawania stopni naukowych i tytułu – w świetle znowelizowanej ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” (Wrocław, 26.09.2014), przeprowadzone przez Agencję Szkolenia i Promocji Kadr, Centrum Szkolenia, Zespół ds. Nauki i Szkolnictwa Wyższego w Warszawie;
- 2014** - seminarium „Technologia w służbie społeczeństwu. Nowe oblicze spektrometrii mas LC-MS/MS”, Shim-Pol, Shimadzu Excellence In Science (Wrocław, 03.04.2014);
- 2012** - konferencja „Naprotechnology™ w diagnozowaniu i leczeniu niepłodności, szanse-wyzwania efekty” (24.03.2012).

c) Członkostwo w międzynarodowych i krajowych organizacjach oraz towarzystwach naukowych:

- Polskie Towarzystwo Toksykologiczne (od 2014 r.), członek

d) Osiągnięcia dydaktyczne i w zakresie popularyzacji nauki lub sztuki:

Jako pracownik naukowo-dydaktyczny Katedry i Zakładu Chemii i Immunochemii Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, prowadzę zajęcia dydaktyczne z zakresu:

- chemii medycznej (seminaria i ćwiczenia) dla studentów I-go roku Wydziału Lekarskiego i Lekarsko-Stomatologicznego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu;
- chemii medycznej (seminaria i ćwiczenia) w języku angielskim dla studentów I-go roku English Division (Medicine i Dentistry) Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu;
- chemii ogólnej z elementami chemii nieorganicznej (ćwiczenia) dla studentów I-go roku kierunku Dietetyka Wydziału Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu;
- chemii organicznej (ćwiczenia) dla studentów I-go roku kierunku Dietetyka Wydziału Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu;
- immunologii (ćwiczenia) dla studentów II-go roku Analityki Medycznej Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu;
- prowadziłam wykłady w ramach cykli zajęć fakultatywnych: „Chemiczne składniki żywności”, „Mikroheterogenność glikoprotein”, „Aktywne biologicznie lipidy pochodzenia roślinnego i zwierzęcego”, dla studentów I i III roku Wydziału Lekarskiego (rok akademicki

2005/2006, 2006/2007, 2007/2008, 2008/2009, 2009/2010) oraz dla studentów I roku Wydziału Lekarskiego English Division (rok akademicki 2006/2007, 2008/2009, 2009/2010, 2010/2011).

Rozdziały w monografiach, podręcznikach i współautorstwo skryptów:

- Mirosława Ferens-Sieczkowska, Iwona Kątnik-Prastowska, Małgorzata Kłonowska, **Ewa Kratz**, Magdalena Orczyk-Pawiłowicz, Magdalena Przybysz, Małgorzata Pupek; pod kierunkiem Iwony Kątnik-Prastowskiej: Skrypt do ćwiczeń z chemii medycznej dla studentów I roku Wydziału Lekarskiego i Wydziału Lekarsko-Stomatologicznego. Wrocław : Akad. Med., 2002; 120 s.
- **Ewa Kratz**: Buffers. W: Handbook of chemistry: for students Faculty of Medicine and Faculty of Dentistry; ed. Iwona Kątnik-Prastowska; Wrocław : Wrocław Medical University, 2009; s.21-40. ISBN 978-83-7055-553-5. **Pkt. MNiSW/KBN: 7.000**
- **Ewa Kratz**: The chemical reactions of lipids and steroids. W: Handbook of chemistry: for students Faculty of Medicine and Faculty of Dentistry; ed. Iwona Kątnik-Prastowska; Wrocław: Wrocław Medical University, 2009; s.67-92. ISBN 978-83-7055-553-5. **Pkt. MNiSW/KBN: 7.000**
- **Ewa Kratz**: The chemical reactions of saccharides. W: Handbook of chemistry: for students Faculty of Medicine and Faculty of Dentistry; ed. Iwona Kątnik-Prastowska; Wrocław: Wrocław Medical University, 2009; s.41-65. ISBN 978-83-7055-553-5. **Pkt. MNiSW/KBN: 7.000**
- Barbara Kossowska, **Ewa Kratz**: Reakcje chemiczne cukrowców w układach biologicznych. W: Podręcznik laboratoryjny z chemii medycznej dla studentów I roku Wydziału Lekarskiego i Lekarsko-Stomatologicznego; pod red. Iwony Kątnik-Prastowskiej; Wrocław: Akademia Medyczna im. Piastów Śląskich, 2009; s.53-75. ISBN 978-83-7055-545-0. **Pkt. MNiSW/KBN: 3.000**
- **Ewa Kratz**: Roztwory buforowe. W: Podręcznik laboratoryjny z chemii medycznej dla studentów I roku Wydziału Lekarskiego i Lekarsko-Stomatologicznego; pod red. Iwony Kątnik-Prastowskiej; Wrocław: Akademia Medyczna im. Piastów Śląskich, 2009; s.31-51. ISBN 978-83-7055-545-0. **Pkt. MNiSW/KBN: 3.000**
- Beata Kowalska, **Ewa Maria Kratz**: Styl życia a bezpłodność męska. W: Promocja zdrowia, profilaktyka i opieka w chorobach przewlekłych - współczesne problemy. 2011; s.161-169, T.1; [red. nauk. Anna Abramczyk et al.]; Wrocław: A & A Optimed,. ISBN 83-912589-4-7. **Pkt. MNiSW/KBN: 3.000**

Pełnotekstowe referaty w materiałach zjazdowych:

- **Ewa Kratz**, Krzysztof Borysewicz, Hubert Krotkiewski, Iwona Kątnik-Prastowska.: Expression of IgG glycoforms in different stages of rheumatoid arthritis. W: Proceedings of the 2nd European Conference on Chemistry for Life Sciences. Wrocław, Poland, September 4-8, 2007; Bologna: Medimond S.r.l., 2007; s.103-106 (International Proceedings Division). ISBN 978-88-7587-409-4. **Pkt. MNiSW/KBN: 3.000**

Łączna liczba punktów MNiSW/KBN: 33

Działalność popularyzująca naukę:

- **XVII Dolnośląski Festiwal Nauki 2014:** Ewa M. Kratz, „Antyoksydanty w diecie – za i przeciw”;
- **XVI Dolnośląski Festiwal Nauki 2013:**
 1. Anna Kałuża, Beata Olejnik, Ewa M. Kratz, „Wpływ diety i jej suplementów na męską płodność”;
 2. Beata Olejnik, Anna Kałuża, Ewa M. Kratz, „Styl życia a płodność męska – problem XXI wieku”;
- **XIV Dolnośląski Festiwal Nauki 2011:** Ewa M. Kratz, „Tajemnicze kwasy tłuszczowe: omega-3: cudowne lekarstwo?”;
- **XI Dolnośląski Festiwal Nauki 2008:** Ewa M. Kratz, „Tajemnicze kwasy tłuszczowe: omega-3 jako „cudowne” lekarstwo?”.

Wykłady na zaproszenie:

- 2014** - wykład wygłoszony na posiedzeniu naukowym Wrocławskiego Oddziału Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego pt.: „Znaczenie kwasów tłuszczowych omega-3 zawartych w diecie” (11.12.2014);
- 2012** - wykład wygłoszony na posiedzeniu Koła Emerytów i Rencistów Politechniki Wrocławskiej pt.: „Kwasy tłuszczowe omega-3 – powrót do medycyny naturalnej?” (01.03.2012);
- 2008** - wykład plenarny: Kratz E, Borysewicz K, Kątnik-Prastowska I: “Glycosylation of main synovial immunoglobulin isotypes in different stages of rheumatoid arthritis”. 17th International Symposium "Molecular and physiological aspects of regulatory processes of the organism". Cracow, 5-6 June 2008; s.238-239.

e) Opieka naukowa nad studentami i doktorantami w charakterze opiekuna naukowego lub promotora pomocniczego:

- **Promotor pomocniczy w przewodzie doktorskim** mgr Ewy Żurawskiej-Płaksej, asystenta w Katedrze i Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu (od 29.05.2014 r.). Tytuł rozprawy doktorskiej: „Ocena zmian profilu białek z rodziny chitynaz w cukrzycy typu 2”.
- **Opiekun/promotor prac magisterskich:**
 - **2012 – promotor;** Urszula Ninierza, studentka Wydziału Farmaceutycznego Oddział Analityki Medycznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Tytuł pracy: „Inhibitory metaloproteinaz 9 i 2 obecne w plazmie nasienia ludzkiego”.
 - **2011 – promotor;** Martyna Kamila Achcińska, studentka studiów stacjonarnych II stopnia Wydziału Farmaceutycznego Oddział Analityki Medycznej Akademii Medycznej we Wrocławiu. Tytuł pracy: „Fukozyłacja immunoglobuliny G pochodzącej z plazmy nasienia ludzkiego”.
 - **2009 – promotor;** Krystyna Kolaszt, studentka studiów stacjonarnych II stopnia Wydziału Farmaceutycznego Oddział Analityki Medycznej Akademii Medycznej we Wrocławiu. Tytuł pracy: „Analiza sekrecyjnej immunoglobuliny w plazmie nasienia ludzkiego”.

- **2008 – opiekun;** Joanna Bednarczyk, studentka Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Tytuł pracy: „Fukozylacja α_1 -kwaśnej glikoproteiny w plazmie nasienia ludzkiego”.
- **2000 – opiekun;** Edyta Moneta, studentka Wydziału Farmaceutycznego Oddział Analityki Medycznej Akademii Medycznej we Wrocławiu. Tytuł pracy: „Mikroheterogenność alfa-1-kwaśnej glikoproteiny plazmy nasienia”.
- **Kierownictwo prac licencjackich:**
 - **2009** - Martyna Kamila Achcińska, studentka studiów stacjonarnych I stopnia Wydziału Farmaceutycznego Oddział Analityki Medycznej Akademii Medycznej we Wrocławiu. Tytuł pracy: „Mechanizmy molekularne związane z zapłodnieniem”.
 - **2006** - Sylwia Kozak, studentka studiów stacjonarnych I stopnia Wydziału Farmaceutycznego Oddział Analityki Medycznej Akademii Medycznej we Wrocławiu. Tytuł pracy: „Ocena znaczenia glikoformy agalakto-IgG w reumatoidalnym zapaleniu stawów”.
- **Inne dokonania:**
 - **Od kwietnia 2014 roku opiekun Studenckiego Koła Naukowego** „Biomarkery w diagnostyce medycznej” działającego przy Katedrze i Zakładzie Chemii i Immunochemii Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.
 - **Recenzje prac magisterskich: w latach 2009-2012** napisałam 6 recenzji prac magisterskich, w tym 1 pracy zgłoszonej w Konkursie Prac Magisterskich Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.
 - **2003-2013: wykłady z podstaw chemii** w języku angielskim w ramach kursu przygotowawczego dla studentów I roku English Division (Medicine i Dentistry) Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu.

f) Współpraca naukowa z instytucjami, organizacjami i towarzystwami naukowymi w kraju i za granicą:

- Institute of Pathophysiology and Allergy Research, Center for Pathophysiology, Infectiology and Immunology, Medical University of Vienna, Waehringer Guertel 18-20 Vienna, Austria (od 2013);
- Department of Animal Physiology and Ethology, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Mlynska dolina B2, 84215 Bratislava, Slovak Republic (od 2013);
- Katedra i Zakład Toksykologii, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, Borowska 211, 50-556 Wrocław (od 2014);
- Katedra i Zakład Biochemii Farmaceutycznej, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, Borowska 211A, 50-556 Wrocław (od 2012);
- II Katedra i Klinika Ginekologii i Położnictwa, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, Szpital Akademicki, Borowska 213, 50-556 Wrocław (od 2011);
- Laboratorium Diagnostyczne przy Szpitalu Akademickim Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, Borowska 213, 50-556 Wrocław (2011-2013); Laboratorium Immunochemii Glikokoniugatów, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda, Polska Akademia Nauk, ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław (2007-2009);

- Laboratorium Embriologiczne InviMed – Europejskie Centrum Macierzyństwa, Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa (od 2002);
- Glycoimmunology Group, Department of Molecular Cell Biology, VU Medical Center, Van der Boechorststraat, BT Amsterdam, The Netherlands (2001-2003).

g) Recenzowanie manuskryptów publikacji w czasopismach międzynarodowych lub krajowych:

- **2015 – praca oryginalna**, “The Distribution of Matrix Metalloproteinase-2, Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2 and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-4 in Psoriatic Skin”, British Journal of Medicine and Medical Research;
- **2015 – praca oryginalna**, “Estimation Of Fertility Index In Deltamethrin Treated Albino Rats”, Andrologia, IF=1.172₂₀₁₄;
- **2015 – praca oryginalna**, “Exposure to iron ore environmental toxicants affects the reproductive potential of adult male Wistar rats”, Journal of International Research in Medical and Pharmaceutical Sciences;
- **2014 – raport techniczny**, “A new technique for human sperm morphology analysis in unstained cells from raw semen”, Reproduction Fertility and Development, IF=2.577₂₀₁₃;
- **2014 – praca pogładowa**, “Testy biochemiczne stosowane w diagnostyce stanu odżywienia”, Dokonania Młodych Naukowców;
- **2014 – praca oryginalna**, “Estimation of Zinc and Copper in Human Seminal Plasma of Sudanese Infertile male”, British Journal of Medicine and Medical Research;
- **2014 – praca oryginalna**, “Different locations of RANTES and its receptor on epididymal spermatozoa”, Reproduction Fertility and Development, IF=2.577₂₀₁₃;
- **2012 – praca pogładowa**, „Heparin and heparin-binding proteins: potential relevance to reproductive physiology”, Current Protein and Peptide Science, IF=2.328₂₀₁₃;
- **2012 – praca oryginalna**, “Clinical significance and expression of PAF and TNF-alpha in semen of leukocytospermic patients”, Mediators of Inflammation, IF=2.417₂₀₁₃.

h) Kierowanie międzynarodowymi lub krajowymi projektami badawczymi oraz udział w takich projektach:

- **2012-2015: główny wykonawca** w grantie NCN (Nr 786/2012), pt.: „Struktury oligosacharydowe glikoprotein plazmy nasienia: zastosowanie spektrometrii masowej i interakcji z lektynami do oceny znaczenia nieprawidłowych struktur cukrowych w etiologii niepłodności męskiej”;
- **2011-2013: opiekun naukowy i wykonawca** w projekcie badawczym dla młodych naukowców realizowanym w Katedrze i Zakładzie Chemii i Immunochemii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu (5/Pbmn), pt.: „Metaloproteiny 9 i 2 oraz ich tkankowe inhibitory TIMP-1 i TIMP-2 w plazmie nasienia ludzkiego”;
- **2011-2012: kierownik** zadania badawczego realizowanego w ramach działalności statutowej Katedry i Zakładu Chemii i Immunochemii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu (ST-562), pt.: „Poszukiwanie nowych markerów procesów zapalnych”;

- **2007-2009: kierownik** projektu badawczego realizowanego w ramach badań własnych Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu (Nr 1606), pt.: „Ekspresja agalakto-glikoformy IgG w różnych stadiach zaawansowania reumatoidalnego zapalenia stawów”;
- **2007-2009: wykonawca** zadania badawczego realizowanego w ramach działalności statutowej Katedry i Zakładu Chemii i Immunochemii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu (ST-91), pt.: „Typy ufukozylowania glikoprotein w płynach ustrojowych w zdrowiu i chorobie”;
- **2004-2006: wykonawca** w projekcie badawczym realizowanym w ramach badań własnych Akademii Medycznej we Wrocławiu (Nr 1040), pt.: „Ocena wpływu selenu na wybrane parametry nasienia ludzkiego oraz reakcję akrosomalną plemników”;
- **2002-2003: główny wykonawca** w grantie promotorskim Komitetu Badań Naukowych (KBN; Nr 3 PO5A 070 23), pt.: „Glikozylacja α_1 -kwaśnej glikoproteiny występującej w plazmie nasienia ludzkiego”;
- **1999-2001: wykonawca** w projekcie badawczym realizowanym w ramach badań własnych Akademii Medycznej we Wrocławiu (Nr 320), pt.: „Molekularne warianty fibronektyny ludzkiej pochodzącej z plazmy nasienia”.

i) Międzynarodowe i krajowe nagrody za działalność naukową albo artystyczną:

- 2014** - nagroda zespołowa JM Rektora Uniwersytetu Medycznego za ważne i twórcze osiągnięcia w pracy naukowej.
- 2012** - nagroda indywidualna I-go stopnia JM Rektora Uniwersytetu Medycznego za ważne i twórcze osiągnięcia w pracy naukowej;
- 2008** - nagroda zespołowa JM Rektora Akademii Medycznej za ważne i twórcze osiągnięcia w pracy naukowej;
- 2004** - nagroda indywidualna II-go stopnia JM Rektora Akademii Medycznej za ważne i twórcze osiągnięcia w pracy naukowo-badawczej za wyróżnioną rozprawę doktorską pt.: „Glikozylacja α_1 -kwaśnej glikoproteiny występującej w plazmie nasienia ludzkiego”.

Ponadto:

- 2010** - nagroda zespołowa JM Rektora Akademii Medycznej za ważne i twórcze osiągnięcia w pracy dydaktycznej.

j) Główny obszar zainteresowań:

- Analiza ekspresji glikoprotein oraz ich profilu i stopnia glikozylacji w ludzkich płynach ustrojowych w różnych jednostkach chorobowych, ze szczególnym uwzględnieniem plazmy nasienia mężczyzn nieplodnych/o obniżonej płodności.
- Ekspresja metaloproteinaz i ich tkankowych inhibitorów obecnych w ludzkiej plazmie nasienia jako parametrów związanych z męską płodnością.
- Zmienność parametrów stresu oksydacyjnego w ludzkiej plazmie nasienia w kontekście męskiej płodności.

04.05.2015 Ewa Kratz