

Wzrost 19.08.15
M. Rodzimek Olczak



Uniwersytet
Wrocławski

Zakład Biochemii, Wydział Biotechnologii
ul. F. Joliot-Curie 14A, 50-383 Wrocław

Prof. dr hab. Mariusz Olczak
Wydział Biotechnologii
Uniwersytetu Wrocławskiego

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
DZIEKANAT WYDZIAŁU LEKARSKIEGO

wpt. dn. 13 SIE. 2015

Licz. DL/ 2882/15

Znak sprawy DL-

Wrocław, 12 sierpnia 2015 r.

Ocena

Pracy doktorskiej mgr Beaty Olejnik

pt.: „Ocena wybranych parametrów glikozylacji: ekspresji fukozy i oligosacharydów wysokomannozowych w plazmie nasienia mężczyzn o obniżonej płodności”

Przedstawiona do oceny praca doktorska Pani mgr Beaty Olejnik jest zbiorem trzech prac naukowych, opublikowanych w latach 2013-2015. Dwie z nich to prace eksperymentalne zamieszczone w specjalistycznym periodyku Asian Journal of Andrology oraz w czasopiśmie International Journal of Molecular Sciences. Trzecia praca ma charakter przeglądowy, została wydana w czasopiśmie Biomarkers. Doktorantka jest pierwszym i jednocześnie wiodącym autorem w obu pracach eksperymentalnych, jej udział w powstaniu pracy przeglądowej był mniejszy. Zestaw prac został uzupełniony autoreferatem, zawierającym podstawy teoretyczne projektu doktorskiego, skrótowy opis przeprowadzonych badań oraz spis literatury. W opracowanym zestawieniu znajdują się także oświadczenia współautorów wyżej wymienionych publikacji dotyczące deklaracji o ich wkładzie własnym.

Promotorem ocenianej prac doktorskiej jest Pani dr hab. Mirosława Ferens-Sieczkowska, która od wielu lat zajmuje się badaniem glikozylacji białek, zarówno pochodzenia roślinnego jak też zwierzęcego. Naturalne jest więc zainteresowanie badaniami materiału ludzkiego, w kontekście wykrywania potencjalnych różnic w glikozylacji, występujących w różnych stanach patologicznych. Przykładem takich badań jest praca doktorska mgr Beaty Olejnik, dotycząca określania zmian glikozylacji białek występujących w plazmie nasienia mężczyzn o obniżonej płodności. Badania te mają charakter badań podstawowych, jednakże można sobie wyobrazić, że potwierdzenie tego typu zmian może być podstawą do opracowania relatywnie prostego testu diagnostycznego.

Praca doktorska jest zbiorem trzech manuskryptów opublikowanych w dobrych czasopismach naukowych. Przed merytoryczną oceną doktoratu, chciałbym zaznaczyć, że osobiście nie jestem zwolennikiem tego rodzaju doktoratów, przede wszystkim dlatego, że trudniej jest wtedy ocenić indywidualny wkład doktoranta w ogół prac. Poza tym naturalne jest, że publikacje naukowe, z powodu często znacznych ograniczeń w ich objętości, zawierają zwykle znacznie skróconą wersję opisu eksperymentów naukowych i często pomijają dane, które są kluczowe dla oceny wiarygodności wyników (w tym przypadku np.: zdjęcia żeli i membran, dodatkowe tabele z wynikami, etc.), bazując często na wynikach statystycznych, podawanych w bardzo skondensowanej formie. Z drugiej strony, ocena zewnętrznych recenzentów zaproszonych do oceny publikacji naukowych zwiększa wiarygodność uzyskanych wyników i potwierdza ich wysoki poziom.

Ocena merytoryczna i metodologiczna

Na prezentowaną pracę doktorską składają się dwie prace eksperymentalne oraz jedna praca przeglądowa. W swojej ocenie merytorycznej uwagę poświęcę przede wszystkim obu pracom eksperymentalnym, w których Doktorantka jest autorem dominującym i wykonała większość opisanych doświadczeń.

Problem niepłodności mężczyzn, wynikający z nieprawidłowych parametrów nasienia, dotyczy stosunkowo dużego odsetka populacji. Dlatego istotnym jest opisanie podstaw molekularnych tego typu schorzeń. Niewątpliwie takim czynnikiem mogą być nieprawidłowości (zmiany) w składzie plazmy nasienia, aczkolwiek z dostępnej literatury naukowej wynika, że takie twierdzenie nie zostało jednoznacznie udowodnione. Jeśli nawet tak nie jest i wspomniane zmiany mają charakter wtórny, nie wpływając bezpośrednio na obniżenie zdolności do zapłodnienia, to jednak być może ich wykrycie może być wykorzystane jako wygodny molekularny marker diagnostyczny. Naturalne jest, że badaczy interesują zmiany podstawowych składników płynu nasiennego, czyli między innymi sekrecyjnych białek, których zidentyfikowano w nim kilkaset. Ich heterogenność wynika z potranslacyjnych modyfikacji; u białek sekrecyjnych normą jest, że różnice te spowodowane są przede wszystkim zmianami w budowie dołączonych oligomerów cukrowych, przyłączonych wiązaniami N- lub O-glikozydowymi (choć może to być także na przykład odmienna, ograniczona proteoliza). Bazując na dużym doświadczeniu promotora i zespołu badawczego Katedry Chemii i Immunochemii pod kierunkiem Pani Profesor Iwony Kątnik-Prastowskiej w badaniu glikozylacji makromolekuł, Doktorantka postanowiła zbadać zmiany w glikozylacji białek plazmy nasienia. Jej celem była analiza zmian w fukozytacji (praca opublikowana w *Asian Journal of Andrology*) oraz ocena występowania glikanów z terminalnymi resztami mannozy (praca przyjęta do druku w *International Journal of Molecular Sciences*).

Przedstawione w obu pracach wyniki są godne uwagi. Doktorantka stwierdziła znaczący wzrost fukozytacji białek we wszystkich grupach pacjentów z obniżoną zdolnością do zapłodnienia. Jeszcze ciekawsze wydają się być wyniki, wskazujące na obniżenie ilości N-glikanów wysokomanozowych (i/lub hybrydowych) w plazmie nasienia osobników niepłodnych ale tylko w grupie normozoospermicznej, czyli tam, gdzie podstawowe parametry nasienia (zawartość w przeliczeniu na jednostkę objętości oraz ruchliwość plemników), nie są zaburzone. To bardzo ciekawa obserwacja, mogąca w przyszłości posłużyć jako marker molekularny. Należy zaznaczyć, że osiągnięte wyniki mają charakter oryginalny i stanowią niewątpliwie cenny wkład w badania nad zmianami w składzie plazmy nasienia osób z obniżoną zdolnością do zapłodnienia. Na pochwałę zasługuje jasno postawiony cel pracy, logiczny ciąg przeprowadzonych doświadczeń, biegłość w stosowaniu technik badawczych (głównie związanych z elektroforezą i lektynoblottingiem, chociaż Doktorantka nie ma problemu z wykorzystaniem nowoczesnych metod spektrometrii masowej, szkoda, że w nieco ograniczonym zakresie). Dobór literatury jest prawidłowy. Muszę także przyznać, że rozbudowany autoreferat czyta się z przyjemnością ponieważ jest napisany dobrym językiem polskim. Jedyne, czego można się doszukać, to nieliczne fragmenty żargonu laboratoryjnego, w których Doktorantka używa słów nieistniejących w języku polskim, takich jak „blot” (membrana po transferze) czy „poolowanie” (zbieranie, zlewanie). Nie podoba mi się, niestety powszechnie używane w wielu polskich pracach naukowych, określenie „ekspresja” (w tym przypadku jest ono użyte nawet w tytule ocenianej pracy doktorskiej). Wprawdzie to słowo występuje w języku polskim ale oznacza zupełnie coś innego, niż intencja Doktorantki. W tym przypadku chyba lepiej było użyć słowa „występowanie” lub „obecność”.

Jak uprzednio wspomniałem, wszystkie prace zostały opublikowane w dobrych, specjalistycznych czasopismach (Impact Factor ok 2,5). Aczkolwiek nie jestem zwolennikiem ocen jakości manuskryptu na podstawie wielkości tzw. współczynnika oddziaływania, gdyż parametr ten dotyczy raczej średniej rangi czasopisma a nie konkretnej publikacji, jednakże bardziej renomowane czasopisma mają zwykle większe wymagania co do doboru recenzentów. Wszystkie prace składające się na oceniany doktorat przeszły pomyślnie przez proces oceny redakcyjnej i moim zdaniem nie ma żadnych podstaw aby podważać te decyzje. Jednakże mam parę pytań i wątpliwości, na które chciałbym usłyszeć odpowiedzi podczas publicznej obrony pracy doktorskiej.

1. W pracy dotyczącej badania fukozytacji stosowano lektynę AAL, specyficzną (w mniejszym lub większym stopniu) wobec cząsteczek fukozy związanej różnymi typami wiązań glikozydowych z N-acetyloglukozaminą lub galaktozą. Zastanawiam się, czy nie prościej było by analizować w tym przypadku po prostu zawartość monocuru fukozy w badanym materiale, po uprzedniej kwaśnej hydrolizie, przekształceniu monocukrów w lotne pochodne i rozdziale w chromatografii gazowej. Wbrew pozorom jest to bardzo prosta, łatwa, niezwykle czuła, relatywnie tania i szybka procedura, pozwalająca na bardzo precyzyjne i ilościowe określenie stopnia fukozytacji (szczególnie jeśli zastosujemy odpowiednie standardy wewnętrzne i zewnętrzne). Przy jednoczesnym precyzyjnym pomiarze stężenia białka w roztworze (a nie, jak w ocenianych pracach, na podstawie analiz densytometrycznych) błąd pomiaru byłby nieporównywalnie niższy.

2. Czy zmiany w fukozytacji dotyczyły tylko niektórych osobników o obniżonej płodności, będących w mniejszości ale wykazujących bardzo duże odchylenie od normy w tym zakresie czy też dotyczyły (w mniejszym lub większym stopniu) wszystkich próbek pobranych od pacjentów z badanymi grupami badawczymi, w których wykazano wzrost zawartości terminalnej fukozy ? Byłbym bardzo ciekaw przykładowego zbiorczego opracowania tabelarycznego w miejsce nieklarownych opracowań statystycznych (co do ich wiarygodności będę pisał nieco później). Mam też wątpliwości czy prosta zależność: obniżenie płodności = wzrost fukozytacji białek plazmy nasienia, jest prawdziwa, innymi słowy czy taka korelacja została udowodniona. Czy wykluczono inne czynniki, na przykład takie jak wiek badanych mężczyzn, ich inne potencjalnie zdiagnozowane schorzenia, tryb życia (np.: preferowana dieta) i wiele innych. W manuskryptach nic nie ma na ten temat. Wydaje mi się, że dobrze było by także określić, czy zmian fukozytacji nie było na przykład w reporterowych glikoproteinach osocza krwi. Zdaję sobie sprawę, że w tym przypadku Doktorantka mogła nie mieć dostępu do materiału biologicznego ale takie badania byłyby bardzo interesujące.

3. Do pomiarów zmian fukozytacji oraz występowania terminalnych struktur mannozowych Doktorantka stosowała klasyczną technikę lektynoblottingu, z wykorzystaniem lektyn AAL i GNL. W badaniach przesiewowych jest to jak najbardziej polecana metoda, umożliwiająca jednoczesną analizę nawet kilkudziesięciu próbek. Mam jednakże spore zastrzeżenia co użyciu analizy statystycznej, bazującej na pomiarach densytometrycznych. Z natury takie pomiary są obarczone kolosalnym błędem, związanym z wieloetapowym procesem przygotowawczym oraz (a może przede wszystkim) z niedoskonałościami technicznymi współczesnych kamer CCD, szczególnie przy skrajnych wysyceniach koloru (ekstremalnie dużych lub bardzo małych). Prowadzi to do błędów dochodzących czasami do kilkuset % w stosunku do wartości realnych i taka analiza po prostu nie ma sensu. Wydaje się, że doktorantka zdawała sobie sprawę z tego

problemu, starając się takie błędy zminimalizować. Moim zdaniem lepiej jest jednak przedstawić zdjęcia szeregu wybarwionych membran, gdzie jasno będzie można wnioskować o wystąpieniu (bądź nie) badanych różnic (jak na rys.1A z publikacji w Int J Mol Sci). Szkoda, że podczas pisania tej recenzji nie miałem możliwości zobaczenia rzeczywistych wyników uzyskanych po elektrotransferze, w publikacji są tylko wybrane zdjęcia żeli i błon nitrocelulozowych, na podstawie których nie można wiele wnioskować.

4. Byłbym ciekaw czy różnice w fukozytacji mają charakter jakościowy, tzn. czy dotyczą konkretnych typów fukozylowanych oligomerów cukrowych? Z publikacji dotyczącej zmian w mannozytacji wynika, że takie badania można było przeprowadzić, korzystając z dostępu do spektrometru masowego Maldi-TOF. Dlaczego ich nie wykonano? Pytanie odnosi się w zasadzie także do pracy dotyczącej wykrywania oligomerów wysokomannozowych, gdzie spektrometrię Maldi-TOF wykonano w bardzo ograniczonym zakresie, nie korzystając z niej w celu wykrycia potencjalnych różnic molekularnych w strukturach oligomerów uzyskanych z grupy kontrolnej na tle grupy normozoospermicznej.

5. Mam też kilka uwag dotyczących samej treści manuskryptów. W pracy dot. fukozytacji, ścieżka z wybarwionymi białkami w wielu miejscach „rozjeżdża się” z głównymi pasmami wybarwionymi lektyną AAL. Czy do porównań i wyliczenia fukozytacji „właściwej” (w przeliczeniu na ilość białka) brano region wybarwiony lektyną, zakładając, że dotyczy on pasma białkowego o największej intensywności (i będącego najbliższym) czy też uznawano za najbardziej wiarygodne pomiary fragmentu żelu „białkowego” precyzyjnie na tej samej „wysokości” co lektyna wybarwiająca fukozylowane glikoproteiny, bez względu na to, co pokazuje densytogram białkowy? Kolejną niejasnością (w tym samym artykule) jest deklaracja o równym współdziałaniu autorów publikacji, ale przy nazwiskach nie ma odpowiednich oznaczeń. Poza tym na rysunkach zawierających zbiorcze dane opracowane statystycznie (nr 2 i 3) w podpisie pod rysunkiem opisano, że literką „F” mają być oznaczone pomiary grupy pacjentów normozoospermicznych. Problem w tym, że na samych rysunkach symbol „F” nigdzie nie występuje. Z kolei w publikacji dotyczącej zmian w mannozytacji na rysunku nr 1 przedstawiono reprezentatywne profile lektynowe i białkowe. Czego one dotyczą? Ścieżki 1-7 i 9-14 podpisano „individual samples”. Co to oznacza? Jest to bardzo niejasne. Jakie było pochodzenie tych próbek, dlaczego ich nie opisano. Dlaczego było ich aż 14, nie wystarczyłaby jedna? Czy próbki 1-7 i 9-14 są tymi samymi preparatami wybarwionymi w dwojaki sposób czy też nie mają ze sobą żadnego związku?

Wniosek końcowy

Przedstawiona do oceny praca doktorska Pani mgr Beaty Olejnik, na którą składają się trzy angielskojęzyczne publikacje przyjęte do druku w dobrych czasopismach specjalistycznych o zasięgu światowym jest logicznym opisem dobrze zaplanowanych i wykonanych eksperymentów naukowych. Najważniejszym osiągnięciem tych badań jest stwierdzenie o zwiększonej fukozytacji białek osób o obniżonej zdolności do zapłodnienia oraz znaczący spadek ilości N-glikanów zawierających terminalne reszty mannozy u grupy pacjentów normozoospermicznych. Chociaż badanie podstaw molekularnych tych zmian wymaga niewątpliwie dalszych badań, nie jest wykluczone, że ciekawe obserwacje poczynione przez doktorantkę mogą w przyszłości doprowadzić do zaproponowania prostego i

taniego testu diagnozującego wyżej wymienione schorzenia. Mimo moich kilku krytycznych uwag, jestem przekonany, że praca doktorska Pani mgr Beaty Olejnik pt.: „Ocena wybranych parametrów glikozylacji: ekspresji fukozy i oligosacharydów wysokomannozowych w plazmie nasienia mężczyzn o obniżonej płodności” spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami) i dlatego wnioskuję do Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o nadanie tytułu doktora Pani mgr Beacie Olejnik.

Prof. Mariusz Olczak

