



Prof. dr hab. Grzegorz Bartosz  
Katedra Biofizyki Molekularnej  
Uniwersytetu Łódzkiego

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Skólmowskiej pt.  
„Enzymosomy antyoksydacyjne – otrzymywanie, badanie właściwości oraz  
możliwości wykorzystania w przechowywaniu nasienia knurów”**

Powszechność stresu oksydacyjnego w fizjologii i patologii i jego negatywne skutki skłaniają do podejmowania prób stosowania antyoksydantów i enzymów antyoksydacyjnych dla ochrony komórek i organizmów przed szkodliwymi skutkami działania reaktywnych pochodnych tlenu. Pozytywne skutki takich interwencji są jednak, jak na razie, ograniczone. Dlatego też rozprawa doktorska mgr Magdaleny Skólmowskiej podsumowująca badania zmierzające do zwiększenia u żywotności plemników knura poprzez stosowanie preparatu zawierającego liposomach koniugaty enzymów: dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy, jest interesująca zarówno z poznawczego punktu widzenia, jak i ze względu na potencjał praktycznego zastosowania.

Praca ma właściwy układ. Otwiera ją *streszczenie* w języku angielskim i polskim, *Wstęp* przedstawiający istotę i wagę zagadnienia oraz kompetentnie napisany *Przegląd piśmiennictwa*, omawiający m. in. reaktywne formy tlenu układy antyoksydacyjne, liposomy, enzymosomy, koniugację enzymów antyoksydacyjnych oraz nasienie i plemniki, w kontekście reaktywnych form tlenu, układu antyoksydacyjnego i przechowywania. W trakcie lektury tej części rozprawy nasunęła mi się refleksja, że mogłaby ona być podstawą co najmniej jednego artykułu przeglądowego. Pubmed pokazał, że artykuł taki, dotyczący enzymosomów antyoksydacyjnych, został przez Doktorantkę i Jej Promotora napisany i ukazał się w 2011 roku w czasopiśmie *Postępy Medycyny i Higieny Doświadczalnej*.

Jako cel pracy Doktorantka postawiła sobie opracowanie metody wytwarzania stabilnego antyoksydacyjnego preparatu enzymatycznego, który będzie mógł przedłużać zdolność zapładniającą plemników nasienia knura. Przydatność takiego preparatu byłaby niewątpliwa ze względu na konieczność przechowywania nasienia knura w stanie niezamrożonym, w temperaturze 17°C, co zwiększa narażenie plemników na działanie reaktywnych pochodnych tlenu. Doktorantka zdecydowała się na zastosowanie w tym celu enzymosomów zawierających

związane z dekstranem koniugaty dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy, dwu podstawowych enzymów antyoksydacyjnych.

Kolejna część pracy to *Materiały i Metody*, opisane należyście szczegółowo. *Wyniki* przedstawione są w sposób ogólnie właściwy (uwagi co do ich prezentacji przedstawiam poniżej). Doktorantka stosowała do otrzymania enzymosomów dysmutazę ponadtlenkową izolowaną z główek czosnku jadalnego *Allium sativum*. Czterostopniowa procedura izolowania enzymu pozwoliła na jego 4-krotne oczyszczenie z wydajnością 22% (w stosunku do ekstraktu chloroformowo-etanolowego) co dało preparat enzymatyczny o aktywności około 3100 jednostek pirogalolowych/mg białka. Katalaza użyta do doświadczeń otrzymywana była poprzez dwuetapowe oczyszczanie handlowego preparatu (liofilizowanej katalazy z wątroby bydłowej). Autorka rozprawy uzyskała 1,65-krotne oczyszczenie preparatu z wydajnością 49%. Procedury oczyszczania enzymów zostały dobrze opisane; jedynym mankamentem dokumentacji jest jakość zdjęć rozdziałów elektroforetycznych (Ryc. 5.3 i 5.6), która nie pozwala na określenie homogenności otrzymanych preparatów białkowych.

Kolejnym etapem pracy było otrzymanie koniugatów dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy oraz połączonych ze sobą za pomocą aldehydu dekstranu. Doktorantka wykonała 12 preparatów różniących się składem i aktywnością enzymów, kolejnością ich wiązania oraz stopniem oligomeryzacji. Następnie optymalizowała metodykę tworzenia enzymosomów (40 różnych preparatów) i porównywała ich stabilność w temperaturach  $-20^{\circ}\text{C}$  i  $4^{\circ}\text{C}$  przez okres 8 tygodni (24 preparaty). Optymalizacja obejmowała m. in. zbadanie zależności wydajności inkapsulacji od stężenia białka w roztworze, stosunku lecytyny do cholesterolu oraz różnych technik tworzenia liposomów. Doświadczenia te doprowadziły do wniosku, że zwiększona zawartość cholesterolu, odpowiedni zakres stężeń białka w roztworze (2,5-5 mg/ml) i zastosowanie techniki zamrażania-rozmrażania, a następnie wytlaczania liposomów przez ekstruder o średnicy por 400 nm pozwala na wytworzenie stabilnych enzymosomów. Szkoda nieco, że stabilność enzymosomów nie była badana w temperaturze  $17^{\circ}\text{C}$  tj. w temperaturze, w jakiej były one stosowane.

Kluczowym elementem pracy było zbadanie wpływu enzymosomów zawierających katalazę, dysmutazę ponadtlenkową oraz koniugaty enzymów na żywotność plemników w standardowo rozcieńczonej spermie knura podczas 12-dobowej inkubacji w temperaturze  $17^{\circ}\text{C}$ . Doktorantka

zaobserwowała obniżenie rozpuszczalności tlenu w wyniku dodania enzymosomów do rozrzedzalnika, jakkolwiek nie wpływało to na maksymalną szybkość reakcji redukcji tlenu w obecności bursztynianu. Wyniki pomiarów aktywności oddechowej plemników wykazały, że wzbogacenie standardowo stosowanego rozrzedzalnika enzymosomami zawierającymi koniugat katalazy i dysmutazy ponadtlenkowej chroni plemniki knura przed szkodliwym działaniem reaktywnych form tlenu zachowując niezmienną szybkość zużycia tlenu w stanie oddechowym 4. Nie jest jasne, dlaczego tylko ten parametr był przedmiotem analizy i dlaczego nie objęła ona oznaczenia żywotności i ruchliwości plemników, co jest przecież podstawowym kryterium oceny ich przydatności. Otrzymane wyniki są jednak jednoznaczne i mogą stanowić punkt wyjścia dla dalszych badań.

Mam ogólną uwagę dotyczącą prezentacji graficznej wyników badań. Regułą jest, by na osiach, zwłaszcza na osi rzędnych przedstawiać wielkości fizyczne i ich jednostki miary. Wykresy 5.18, 5.19 i 5.21 podają tylko jednostki miary. Informacja podana w legendzie Ryc. 5.18 jest niepełna; podane są objętości dodawanych roztworów wyjściowych i ich stężenia, brak jest informacji o objętości próbki, do której były one dodawane. Bardziej jednoznaczne byłoby podanie końcowych stężeń dodawanych reagentów w próbce.

Obszerna, 22-stronicowa Dyskusja wystawia świetne świadectwo znajomości piśmiennictwa przedmiotu, krytycyzmowi i dojrzałości naukowej Doktorantki. Mam kilka drobnych uwag do tej części pracy. Trudno mi zgodzić się z poglądem, że dostępna na rynku dysmutaza ponadtlenkowa „jest głównie otrzymywana z surowicy krwi zwierząt” (s. 96). CuZn-SOD (ta forma jest przede wszystkim dostępna komercyjnie) jest enzymem wewnątrzkomórkowym, trudno więc byłoby pozyskiwać ją z surowicy. Nie do końca podzielam też pogląd o łatwym przenikaniu anionorodnika ponadtlenkowego przez dwuwarstwę lipidową. Na s. 112 podane są ilości, a nie stężenia dodawanego askorbinianu (wartości w mg; nie jest jasne, w odniesieniu do jakiej objętości rozrzedzalnika).

W oparciu o uzyskane wyniki Doktorantka formułuje pięć wyważonych *Wniosków*.

Cytowane piśmiennictwo obejmuje 212 pozycji; są to w znakomitej większości oryginalne prace anglojęzyczne. Niestety format piśmiennictwa nie jest konsekwentny, obok skrótów czasopism pojawiają się pełne tytuły, nie jest też ujednolicona konwencja podawania stron. Rozprawa zaopatrzona jest w pomocny *Wykaz skrótów*.

Ogólnie staranność edytorska i strona graficzna rozprawy robi bardzo dobre wrażenie.

Moja ogólna ocena rozprawy doktorskiej jest bardzo pozytywna. Relacjonuje ona we właściwej formie wyniki pracochłonnego projektu, zakończonego propozycją konkretnej procedury otrzymywania enzymsomów, mogących zwiększyć żywotność plemników knura w standardowych warunkach przechowywania. Procedura ta może zapewne być przedmiotem zgłoszenia patentowego.

Uważam, że rozprawa spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim przez art. 14 i 15 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. z późniejszymi zmianami. Z pełnym przekonaniem wnoszę więc do Wysokiej Rady Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr Magdaleny Skólmowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Łódź, dnia 29 sierpnia 2014

  
Prof. dr hab. Grzegorz Bartosz