

Wrocław, 05.01.15

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Magdaleny Skólmowskiej pt. "Enzymosomy antyoksydacyjne- otrzymywanie, badanie właściwości oraz możliwości wykorzystania w przechowywaniu nasienia knurów" wykonanej na Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Marka Kmiec.

1. Ogólna charakterystyka rozprawy

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr **Magdaleny Skólmowskiej pt. "Enzymosomy antyoksydacyjne- otrzymywanie, badanie właściwości oraz możliwości wykorzystania w przechowywaniu nasienia knurów"** jest oprawionym wydrukiem komputerowym złożonym z 131 stron formatu A4. Układ pracy jest typowy dla dysertacji doktorskich w dziedzinie eksperymentalnych nauk z zakresu biologii i zawiera osiem uporządkowanych, objętościowo zrównoważonych, odpowiednio ilustrowanych i starannie opracowanych rozdziałów. Wyniki badań są poparte odpowiednio zredagowanymi wykresami i tabelami. Praca jest napisana jasnym językiem naukowym.

Pracę realizowano w Katedrze Genetyki i Ogólnej Hodowli Zwierząt Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. Badania były finansowane ze środków własnych ZUT, Narodowego Centrum Nauki w Krakowie projekt badawczy N N311 546540 i projektu badawczego rozwojowego – 517-01-022-3289/17 (instytucji finansującej nie podano)

2. Ocena merytoryczna pracy

Ocena ogólna

Sztuczna inseminacja samic zwierząt gospodarskich i towarzyszących jest obecnie jedną z najważniejszych metod biotechnicznych, która zapewnia optymalne wykorzystanie potencjału rozrodczego samców, zwiększa ostrość selekcji i postęp hodowlany a także zmniejsza koszty utrzymania samców, ogranicza rozprzestrzenianie chorób przenoszonych drogą płciową i umożliwia krajowy i międzynarodowy obrót nasieniem. W Polsce sztuczna inseminacja loch obejmuje ok. 45% pogłowia samic. Do zabiegów sztucznego unasienia używa się nasienie knurów rozcieńczone w rozrzedzalniku pozwalającym na przeżycie plemników jedynie przez maksymalnie 4-7 dni. Ze względu na bardzo wysoką wrażliwość plemników knurów na

Strona 1

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr **Magdaleny Skólmowskiej pt. "Enzymosomy antyoksydacyjne- otrzymywanie, badanie właściwości oraz możliwości wykorzystania w przechowywaniu nasienia knurów"** wykonanej na Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Marka Kmiec

zmiany wartości temperatur towarzyszących procesom kriokonserwacji i dużą zmienność osobniczą w podatności na proces mrożenia gamet obecnie nie prowadzi zabiegów sztucznej inseminacji nasieniem mrożonym na skalę przemysłową. Dlatego poszukiwanie metod wydłużających czas przydatności nasienia do inseminacji przechowywanego w stanie płynnym było silną przesłanką do podjęcia przez doktorantkę mgr Magdalenę Skólmowską trudnych i wymagających opanowania szerokiego warsztatu naukowego badań. Jednym ze sposobów ochrony komórek przed niekorzystnym wpływem sztucznie stworzonego środowiska hodowlanego jest dodatek do mediów, w tym rozcieńczalników nasienia, komponentów ochrony antyoksydacyjnej. Tezą rozprawy doktorskiej było twierdzenie, że dodatek enzyminosomów zawierających dysmutazę ponadtlenkową i katalazę do nasienia knura przechowywanego w stanie płynnym przedłuży zdolność zapładniającą gamet.

Najważniejszym, w mojej ocenie, osiągnięciem tej pracy było opracowanie metody pozwalającej na uzyskaniu stabilnych preparatów liposomowych złożonych z lecytyny i cholesterolu zawierających enzymy antyoksydacyjne: katalazę, dysmutazę ponadtlenkową i ich koniugatu (utworzenie enzyminosomu zawierającego koniugat dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy jest oryginalnym osiągnięciem autorki pracy) oraz zastosowanie testu oceny zużycia tlenu po aktywacji II mitochondrialnego kompleksu łańcucha oddechowego jako jednej z metod oceny nasienia knurów. Osiągnięciem dodatkowym pracy była izolacja aktywnej dysmutazy ponadtlenkowej z czosnku zwyczajnego. W pierwszym przypadku można uznać, że uzyskane preparaty będą mogły znaleźć zastosowanie jako dodatek do rozcieńczalników nasienia knurów.. Z kolei zastosowanie prób oceny zużycia tlenu przez plemniki może być bardzo cennym uzupełnieniem wachlarza metod zalecanych do oceny nasienia knurów zgodnie z sugestiami Waberski i wsp. z 2011r. o konieczności wprowadzania testów oceny błon komórkowych plemników w układach dynamicznych. Po raz pierwszy bowiem wykazano, że plemniki knura odpowiadają w warunkach in vitro na stymulację II kompleksu mitochondrialnego łańcucha oddechowego i że test ten może być stosowany do oceny funkcji mitochondriów plemników w trakcie przechowywania nasienia w stanie płynnym. Natomiast niejasne jest, w kontekście celu pracy, podjęcie badań nad uzyskaniem SOD z czosnku , ponieważ, pomimo uzyskania aktywnej formy SOD nie została ona wykorzystana w badaniach nad tworzeniem enzyminosomów z koniugatami SOD-AD-CAT (co, wymaga wyjaśnienia przez autorkę dysertacji)

Ocena szczegółowa

Edycja pracy jest bardzo staranna. Autorka wykazała się dbałością o szczegóły w edycji tekstu, w opisach wykresów i tabel.

Wstęp i przegląd piśmiennictwa szczegółowo wprowadza czytelnika w obszar wiedzy objętej zakresem badań, który jest bardzo szeroki i obejmuje zagadnienia dotyczące udziału wolnych rodników w procesach fizjologicznych i patologicznych komórek w tym plemników, systemów antyoksydacyjnych oraz zastosowań liposomów przede wszystkim jako nośników enzymów. Wstęp charakteryzuje wyczerpujący i logiczny przepływ informacji, z których wynikają cele podjętych badań. Cele pracy są sformułowane jasno i konkretnie. Osiągnięcie celów założonych w pracy wymagało od autorki pracy opanowania i zastosowania bardzo zróżnicowanych metod chemicznych, biochemicznych w tym z zakresu enzymologii a także metod badawczych wykorzystywanych w biologii komórki. Dobór metod badawczych analitycznych i preparatywnych, choć bazujący na technikach wprowadzonych w latach osiemdziesiątych i dziewięćdziesiątych ubiegłego stulecia pozwolił na osiągnięcie zamierzonych celów w części dotyczących utworzenia enzymosomów .

Natomiast w kontekście ochronnego antyoksydacyjnego działania uzyskanych preparatów w przeprowadzonych badaniach brakuje wprowadzenia metod rutynowej oceny seminologicznej wykonanej wg standardów takiej oceny, która pozwoliłaby jednoznacznie potwierdzić lub wykluczyć celowość stosowania enzymosomów jako dodatku do rozrzedzalnika. Wśród nich najważniejszymi są : ocena ruchliwości i żywotności plemników nie tylko w dniu założenia doświadczenia ale przede wszystkim w kolejnych punktach czasowych, w których dokonywano pomiarów. Również obecnie dostępne są metody oceny produkcji reaktywnych form tlenu, stopnia peroksydacji błon komórkowych i oceny transbłonowego potencjału mitochondriów plemników, które bezpośrednio wskazywałyby na ochronną rolę tych preparatów.

Dodatkowo w części metodycznej wyjaśnienia wymagają następujące kwestie:

1. niejasne jest wykorzystanie SOD izolowanej z czosnku w pierwszej części badań do tworzenia enzymosomów. Nie wiadomo czy SOD zawarta w enzymosomach zawierających tylko ten enzym i dodawanych do nasienia pochodziła z preparatów

uzyskanych z czosnku czy z preparatów handlowych, które stosowano do uzyskania koniugatu CAT-AD-SOD.

2. jaką objętość roztworu enzymosomów dodawano do poszczególnych prób nasienia i jaka była końcowa objętość prób ? jakie było ich stężenie w rozrzedzalniku w przeliczeniu na stężenie białka lub lipidów?
3. czy zastosowano kontrolę z dodatkiem liposomów, które nie zawierały enzymów antyoksydacyjnych. Brak takiego układu kontrolnego uniemożliwia ocenę wpływu samych komponentów liposomów (lecytyny i cholesterolu) na konsumpcję tlenu plemników, bowiem obydwie komponenty wpływają na stabilność błon komórkowych, a także ocenę toksyczności tych preparatów wobec plemników (którą miarą jest liczba plemników żywych i ruchliwych)
4. brakuje dokładnego opisu metody i wyników oceny skuteczności usuwania błony komórkowej plemników w warunkach hypoosmotycznych . Nie wiadomo w jakim procencie komórek działanie to było skuteczne i na ile integralność wstawki plemnika pozostawała niezmienną?

Podsumowując zastosowane metody badawcze odpowiadają założonym celom pracy jednak ich opis wymaga uzupełnienia a w niektórych częściach same procedury prawdopodobnie wymagają poszerzenia, tak aby wysiłek już włożony w przeprowadzenie eksperymentów mógł być przydatny w rozumieniu niekorzystnych zjawisk towarzyszących przechowywaniu nasienia knurów i ich skutecznemu przeciwdziałaniu.

Wyniki są jasno opisane. Potwierdzają uzyskanie dysmutazy nadtlenkowej z czosnku pospolitego. Potwierdzają także uzyskanie wysoko oczyszczonych i aktywnych preparatów SOD i CAT i oraz koniugatu CAT-AD-SOD i ich zamknięcie w liposomach. Jednak dla pełnej charakterystyki uzyskanych preparatów konieczna wydaje się ocena aktywności enzymatycznej w trakcie ich przechowywania nie tylko dla katalazy ale również dla SOD i koniugatu SOD-AD-CAT, a także określenie wielkości i potwierdzenie jednorodności uzyskanych enzymosomów. Chociaż dodatek enzymosomów i wyniki konsumpcji tlenu przez plemniki w trakcie przechowywania wskazują na pewne różnice w odpowiedzi na stymulację II kompleksu łańcucha oddechowego obserwacja ta nie daje bezpośredniego dowodu na ochronne antyoksydacyjne działanie enzymosomów na plemniki,

ponieważ zależność pomiędzy ilością tworzonych ROS i konsumpcja tlenu przez komórki/plemniki nie jest zależnością jednoznacznie wprost lub odwrotnie proporcjonalną. Z drugiej strony brak alternatywnych metod oceny wielkości stresu oksydacyjnego w plemnikach nie pozwala na ocenę czy w ogóle została naruszona równowaga antyoksydacyjna w trakcie przechowywania nasienia w okresie obserwacji a uzyskane wyniki mogą np. jedynie wynikać ze stabilizacyjnego wpływu cholesterolu lub lecytyny na błony komórkowe .

Podsumowując: wyniki pracy wskazują na potencjalną przydatność uzyskanych preparatów jako związków suplementujących skład rozrzedzalników nasienia knurów jednak nie potwierdzają ich regulującego wpływu na wielkość stresu oksydacyjnego w trakcie przechowywania nasienia a także na tym etapie badań nie można potwierdzić ani wykluczyć ich roli w przedłużaniu zdolności zapładniającej nasienia.

Dyskusja jest bardzo obszernym komentarzem uzyskanych wyników. Potwierdza szeroką wiedzę Autorki w tym znajomość problemu stresu oksydacyjnego, szeroko omawia metody izolacji, oczyszczania i aktywności pozyskiwanych enzymów w różnych źródłach potwierdzając, że użyte w pracy techniki preparatywne dały porównywalny efekt z opublikowanymi wcześniej danymi. Wskazuje również na oryginalny dobór stężeń SOD i CAT, który w procesie koniugacji okazał bardziej wydajny w porównaniu z wynikami innych autorów, przedstawia problemy związane z tworzeniem enzymsomów i utrzymaniem ich pożądanej aktywności enzymatycznej. Dyskusję kończy obszerny akapit dotyczący ochrony antyoksydacyjnej nasienia knurów.

Wnioski odpowiadają wynikom uzyskanym w pracy jedynie wniosek 5 powinien zostać preredagowany, ponieważ żadne z prezentowanych wyników nie wskazują na aktywność aparatu ruchu plemników *per se*.

Konkluzja Biorąc pod uwagę ważność problemu biologicznego i praktycznego, któremu jest poświęcona oceniana rozprawa, teoretyczne przygotowanie Autorki rozprawy do podjęcia badań, trafne założenia badawcze, nakład pracy włożony w wykonanie badań, opanowanie szeregu metod badawczych, uzyskanie oryginalnych rozwiązań w części wskazujących na potwierdzenie stawianej hipotezy i oczekując twórczej dyskusji pozwalającej rozstrzygnąć

zasadnicze niejasności wyłonione w trakcie recenzji uważam, że przedstawiona mi do recenzji praca spełnia wymogi Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki w brzmieniu z dnia 18 marca 2011 r. (Dz. U. Nr 84, poz. 455 z późn. zm.) i zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr Magdaleny Skólmowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego, prowadzących do nadania stopnia naukowego doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biotechnologia.

Wrocław, 05.01.2015

Prof. dr hab.  Anna Chelmońska-Soyta