

Prof. dr hab. Mariusz Olczak
Wydział Biotechnologii
Uniwersytet Wrocławski
Tel. 71-3752710
e-mail: mariusz.olczak@biotech.uni.wroc.pl

Wrocław, 8 lipca 2014

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Skólmowskiej pt: „Enzymosomy antyoksydacyjne - otrzymywanie, badanie właściwości oraz możliwości wykorzystania w przechowywaniu nasienia knurów”

Przesłana do oceny praca doktorska mgr Magdaleny Skólmowskiej została wykonana w Katedrze Genetyki i Ogólnej Hodowli Zwierząt Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie pod kierunkiem profesora Marka Kmiecica. Celem pracy miało być opracowanie liposomowego preparatu, zawierającego enzymy o działaniu antyoksydacyjnym (katalazę i dysmutazę nadtlenkową), który mógłby posłużyć do przedłużania trwałości nasienia rozplodowych knurów. Niestety, moim zdaniem, cel ten nie został nawet w części zrealizowany. Wynika to nie tylko z faktu przyjęcia wielu błędnych założeń, ale także (a może przede wszystkim) z metodycznych błędów podczas realizacji projektu. Stawia to pod znakiem zapytania sens większości przeprowadzonych eksperymentów.

Jak pisze Autorka, realizacja celu miała skupiać się na czterech zagadnieniach:

1. Wyboru tanich i wydajnych metod pozyskiwania i oczyszczania enzymów antyoksydacyjnych - katalazy i dysmutazy nadtlenkowej
2. Zaprojektowania koniugatów katalazy i dysmutazy nadtlenkowej
3. Wyboru składu i metody wykonania enzymosomów
4. Opracowania warunków pomiaru aktywności wybranych enzymów mitochondrialnych, wraz z pomiarem skuteczności działania enzymosomów

Poniżej przedstawiam mój ogólny komentarz odnośnie projektowania i realizacji tych zagadnień:

Ad. 1.

Jeśli w opisie zamierzenia pisze się o wyborze metod, to należy rozumieć, że zamierza się przetestować ich kilka (jednak co najmniej dwie, aby wybrać optymalną). Niestety, tak nie było. Z niewiadomych przyczyn opisano tylko oczyszczanie SOD z czosnku. Co więcej, ten punkt miałby prawo być prezentowany jako oryginalny wynik pracy doktorantki, jeśli był by opisem nowo opracowanych doświadczeń. Tak jednak nie było. Autorka opisuje znaną już uprzednio procedurę (He i wsp, Biochemical Engineering Journal, 2008), pozyskując enzym SOD o porównywalnej aktywności. Ostatecznie można by to uznać jako wstępne prace przygotowawcze. W tym przypadku być może uprawnione było by przedstawienie także skróconego opis procedury (oraz, przykładowo, zdjęcie żelu pokazującego czystość preparatu). Jednakże to mogło by być dopuszczalne

tylko pod dwoma warunkami: po pierwsze - musiało by być umieszczone w rozdziale „Materiały i Metody”, po drugie: oczyszczony enzym powinien być wykorzystany w dalszych doświadczeniach (czyli w tym przypadku do konstrukcji enzymosomów). Niestety, oba warunki nie zostały spełnione. Powtórzenie procedury znanej z poprzedniej publikacji zamieszczono w rozdziale „Wyniki i ich omówienie”. Jest to **NIEDOPUSZCZALNE** w pracy doktorskiej i w zasadzie nosi znamiona plagiatu, mimo tego, że Autorka podaje odpowiedni odnośnik literaturowy. Dlaczego wobec tego uważa, że są to Jej wyniki ? Czyżby tak samo uważał także promotor tej dysertacji ? Podobnie zaskakujący jest fakt, że oczyszczony enzym nie był wykorzystany w dalszych etapach ocenianej pracy. Po co więc zmarnowano na to czas i pieniądze ?

Trochę lepiej wygląda sprawa z doczyszczaniem komercyjnie dostępnej katalazy, która była później użyta do tworzenia koniugatów enzymatycznych. Jednakże, moim zdaniem, ta nieskomplikowana procedura powinna być jedynie wspomniana w rozdziale "Materiały i Metody" jako mało istotny krok przygotowawczy (bo taką jest w rzeczywistości), a nie jako znacząca część rozdziału „Wyniki”. Nie jestem pewny, czy Autorka zdaje sobie sprawę z faktu, że w pracach doktorskich z ostatnich lat (także polskich), autorzy oczyszczając wiele (często kilkadziesiąt) wariantów białkowych (na przykład wariantów z mutacjami), ograniczają się tylko do zwięzłych opisów tych często wieloetapowych procedur, nie uważając ich za istotny wynik naukowy lecz jedynie za prace pomocnicze (wstępne), służące do realizacji właściwego celu naukowego. A są to procedury nieporównywalnie bardziej skomplikowane niż jedna prosta chromatografia, prezentowana przez Autorkę. Poza tym, jeśli doczyszczanie katalazy miało by służyć do stałej produkcji enzymu, to należało opracować efektywną metodę od początku (lub powtórzyć wybraną z literatury procedurę, oczywiście nie opisując tego w rozdziale „Wyniki”). Kupno w firmie Sigma gotowego preparatu jako wyjściowego materiału do komercyjnego wykorzystania mija się z celem z dwóch względów: po pierwsze - korporacja Sigma nie jest w stanie zapewnić stałej jakości swoich produktów (co prawdopodobnie zdarzyło się także Autorce, gdyż kupiony preparat nosi ewidentne znamiona degradacji proteolitycznej), ponieważ sama ich nie produkuje, a jedynie skupuje produkty innych laboratoriów. Innymi słowy produkt o tym samym numerze katalogowym może nie być zawsze tej samej jakości. Po drugie: w każdej chwili taki produkt może zniknąć z oferty. W obu przypadkach nie było by to korzystne dla ewentualnych dalszych badań nad enzymosomami. Jestem też ciekawy, czy doczyszczanie preparatu katalazy było potrzebne ? W pracy nie ma żadnych informacji na ten temat. Może wystarczyło użyć od razu preparat komercyjny ?

Ad 2.

Wbrew temu, co Autorka napisała w celach pracy, synteza koniugatów jest dokładnym powieleniem znanej procedury, a opisane odstępstwa nie uprawniają do opisywania jej jako oryginalnej. Podobnie jak w pkt. 1, opis ten powinien być umieszczony jako prace przygotowawcze w rozdziale „Materiały i Metody”. W tym jednak przypadku dochodzi jeszcze ocena poprawności procedur, zastosowanych przez Autorkę, w szczególności dotyczących wyznaczania mas cząsteczkowych koniugatów na podstawie rozdziału w sączeniu molekularnym. Rozdzielczość tego typu chromatografii zależy od kilku czynników, z których największe znaczenie mają: a) długość użytej kolumny, b) objętość nanoszonej próbki, c) zastosowany przepływ, d) rodzaj złoża. W zasadzie prawidłowo zachowano tylko parametr b (objętość próbki była mała). Jest oczywiste, że na kolumnie o długości 50 cm (80-90 cm to moim zdaniem wartość minimalna, optymalna powyżej 1m) nie ma mowy o wyznaczeniu jakichkolwiek mas cząsteczkowych z wystarczającą rozdzielczością, szczególnie jeśli przepływ jest za duży (42 ml/h, powinien być kilka razy wolniejszy). Dodatkowo żel został wybrany nienajlepiej, a detekcja miała charakter nieciągły (to dodatkowo obniża i tak niedużą

rozdzielczość). Mimo swojej nazwy, żłoże Sephacryl 300 HR (ang. *High Resolution*) nie jest najlepsze do tego typu zastosowań, umożliwia wprawdzie szybkie przepływy i jest bardzo odporne mechanicznie, jednakże dzieje się tak kosztem drastycznej utraty rozdzielczości. Jest zdumiewające, że w „Wynikach” precyzyjnie wskazano na niektóre koniugaty w chromatogramie spośród w sumie 116 wariantów (suma koniugaty + agregaty wg Autorki) na podstawie bardzo niskiej jakości rozdziałów chromatograficznych (co widać gołym okiem, rys. 5.7 i 5.8). Takie autorytatywne stwierdzenia, niepoparte żadnymi dodatkowymi danymi, są rażąco niewiarygodne (np.: stwierdzenie, że maksimum absorpcji dla frakcji 51 odpowiada koniugatowi CAT₆-AD4-SOD₃ !). Pracując (wiele lat temu) nad oczyszczaniem jednego z roślinnych enzymów z grupy hydrolaz przeprowadzałem mnóstwo tego typu rozdziałów na wiele bardziej rozdzielczych, kalibrowanych kolumnach (o długości 100-170 cm, przy przepływach rzędu 1ml/h/cm²) i naprawdę nie było prosto stwierdzić, czy badany enzym jest tetramerem o masie 300 kDa czy też trimerem o masie 225 kDa (co w końcu zostało wyjaśnione, jednakże dopiero po krystalizacji enzymu i określeniu jego budowy przestrzennej). Trudności w oznaczaniu masy cząsteczkowej wynikają także z faktu, że o szybkości migracji w sączeniu molekularnym decyduje też kształt cząsteczek, nie zawsze idealnie kulistych, co w przypadku białek (a tym bardziej ich wielocząsteczkowych koniugatów !) jest typowe. Dziwi zastosowanie mańorozdzielczej metody separacji koniugatów (dodatkowo źle wykonanej) w sytuacji powszechnej dostępności metod spektrometrii mas, które można tanim kosztem zlecić wyspecjalizowanym ośrodkom naukowym, których obecnie w Polsce nie brakuje. Są to metody idealne między innymi w potwierdzaniu skuteczności kowalencyjnego łączenia podjednostek enzymatycznych i badaniu ich stechiometrii (np. Maldi-TOF). Nota bene, uwaga ta odnosi się także do nieco naiwnej (i, moim zdaniem, zupełnie niepotrzebnej) dyskusji dotyczącej mas cząsteczkowych homogenych SOD i CAT. W przypadku tego pierwszego enzymu wszelka dyskusja byłaby zakończona po wycięciu z żelu pasma białkowego, pocięciu białka proteazami i wyznaczeniu pełnej sekwencji z wykorzystaniem spektrometrii mas, co dla tak małego, homogenego białka nie powinno być trudne.

Ad. 3

W punkcie 3 dopracowano metodę pakowania enzymów i koniugatów w liposomy. Nie były to prace oryginalne, Autorka wzorowała się na powszechnie dostępnych metodach. Dobrą stroną tej części pracy jest staranny wybór optymalnych parametrów produkcji liposomów oraz określenie najlepszej procedury w celu uzyskania możliwie stabilnych enzymosomów. To jest, moim zdaniem, także część prac przygotowawczych, tym bardziej, że podobne pakowanie tego typu enzymów do formacji liposomowych było już dokonywane w przeszłości i jest szeroko opisane w literaturze. Jednakże w tym przypadku uprawnione jest umieszczenie tego w rozdziale „Wyniki”, chociaż wartość naukowa uzyskanych rezultatów nie jest duża (wyniki nie są nowatorskie).

Ad 4.

Opracowanie warunków pomiaru aktywności wybranych enzymów mitochondrialnych też nie jest oryginalnym pomysłem Autorki. Nie wpływają na taką ocenę drobne modyfikacje, które nie miały związku z dobrze znaną zasadą działania opisanych uprzednio w literaturze procedur. Oczywiście należy docenić jakość tych pomiarów i ich pracochłonność, jednakże to dalej są tylko procedury przygotowawcze (techniki badawcze). **I dopiero ostatnia część tego zamierzenia, czyli ocena działania przygotowanych enzymosomów na plemniki, jest właściwą pracą doktorską, której wyniki można uznać za w pełni oryginalne i podlegające merytorycznej ocenie przez recenzenta.** A tutaj od razu nasuwają się liczne wątpliwości, poczynając od sensu zapoczątkowania tego typu badań, kończąc na sposobie ich oceny oraz przydatności uzyskanych wyników. Moje główne zastrzeżenia:

1. Materiał, jakim dysponowała Doktorantka był bardzo heterogenny. A ten fakt, w związku z niewielką liczbą próbek nasienia oraz nieznacznymi różnicami w wydajności aparatu oddechowego podczas testów, w praktyce uniemożliwił wysunięcie jakichkolwiek sensownych wniosków. Jednakże największym problemem było, moim zdaniem, założenie, że prędkość zużycia tlenu ma bezpośredni związek ze zdolnością plemników do zapłodnienia. Z rysunku 5.17 wynika, że plemniki o różnej zdolności do zapłodnienia (czyli różniące się ruchliwością) mają takie same szybkości zużycia tlenu! Jeśli zakładamy, że ruchliwość plemników jest wyznacznikiem ich zdolności do zapłodnienia a rysunek 5.17 zawiera poprawne dane, to dalsze eksperymenty Autorki nie mają sensu, gdyż nie widać zależności między efektywnością działania plemników a prędkością zużycia przez nie tlenu (co same w sobie wydaje się trochę dziwne, lecz trudno podważać wyniki zamieszczone na rys. 5.17, nota bene, uzyskane przez Doktorantkę).
2. W pracy nie ma odpowiednich kontroli. Konieczne było zastosowanie wolnych enzymów bez ochrony liposomowej (zarówno SOD, CAT, SOD+CAT i koniugaty CAT i SOD) w testach funkcjonalnych. Nie ma także kontroli z użyciem samych liposomów, co wydaje się być absolutną koniecznością, wiedząc jak poważne zmiany mogą spowodować liposomy w interakcji z błoną komórkową. Interesującymi kontrolami były by także liposomy z nieskoniugowanymi mieszaninami SOD+CAT, stosowanymi w różnych proporcjach, co wyjaśnić mogło by czy stosowanie koniugatów ma sens. Wskazane było by także użycie bardziej zaawansowanych konstruktów, czyli kontroli z liposomami o podobnym składzie białkowym, jednakże pozbawionych odpowiednich własności enzymatycznych. Niewykluczone jest bowiem, że Autorka wcale nie badała wpływu SOD i CAT na plemniki a jedynie działanie samych lipidów i/lub białek zawartych w liposomach.
3. Doktorantka twierdzi, że koniugat SOD-CAT umieszczony w liposomach jest najlepszy spośród wszystkich testowanych układów. Na szczęście dodaje, że takiego wniosku nie potwierdza analiza statystyczna. Moim zdaniem jest to oczywiste. Przeglądając, nawet pobieżnie, zamieszczone tabele 5.7-5.10 i widząc prawie losowe zmiany parametrów tlenowych w badanych próbkach plemników, nie może być inaczej. Wydaje się, że problem tkwi nie tylko w błędnych założeniach samego projektu ale także (a może przede wszystkim) w braku dobrego materiału do badań. Autorka zdaje sobie z tego sprawę, jest to jeden z wniosków zamieszczonych w dyskusji.
4. Nie rozumiem, dlaczego nie zaplanowano żadnego testu funkcjonalnego. Brak jakichkolwiek badań dotyczących zmian w ruchliwości plemników lub wręcz skuteczności działania nasienia bez i z zastosowaniem badanych liposomów praktycznie uniemożliwia stawianie jakichkolwiek wniosków z prezentowanych badań. Z wyników uzyskanych na podstawie efektywności działania mitochondrialnych reakcji wydaje się, że zaproponowane traktowanie plemników liposomami nie ma sensu (przynajmniej tak wynika z opracowania statystycznego), jednak istnieje szansa, że badania funkcjonalne mogły by tę tezę podważyć. Takich badań jednak nie przeprowadzono.

Mniej poważne zastrzeżenia:

We wstępie Autorka wnikliwie opisuje aktualny stan wiedzy dotyczący prezentowanej tematyki. Jednakże swoją wiedzę opiera w ogromnej większości na polskojęzycznych pracach przeglądowych w czasopiśmie o lokalnym zasięgu. Nie jest to najlepszy sposób na prezentację aktualnego stanu wiedzy. Nie jest także pomocny przy ocenie pracy doktorskiej, gdy do źródłowej

pracy nie można dotrzeć bezpośrednio. Być może wynika to z trudności z dostępem do oryginalnych prac lub zrozumieniem i poprawną interpretacją ich treści. Taki wniosek nasuwa się po przeczytaniu tłumaczenia tytułu pracy na język angielski, ponieważ w tej wersji jest całkowicie niezrozumiały. Praca zawiera także nieco błędów logicznych i interpunkcyjnych, jednakże ich liczba nie jest bardzo duża i nie wpływa zasadniczo na treść dysertacji.

Wnioski ogólne:

Doktoranka bardzo wnikliwie analizuje uzyskane rezultaty, co należy pochwalić. Nie zmienia to jednak faktu, że oceniana praca doktorska, mimo niewątpliwie dużego wkładu pracy, w zasadzie nie zawiera żadnego istotnego, nowego wyniku naukowego. Wydaje się, że w pracy nie osiągnięto ani jednego z zaplanowanych celów (może z wyjątkiem uzyskiwania konstrukcji liposomowych, wprowadzie metody mało nowatorskiej ale wykonanej poprawnie). Dodatkowo, mam spore wątpliwości do poprawności niektórych zaplanowanych metod badawczych. Nie rozumiem także, po co opisano znaną wcześniej z literatury procedurę oczyszczania roślinnej dysmutazy ponadtlenkowej, jeśli z niej nie skorzystano w dalszych etapach pracy.

Biorąc pod uwagę wszystkie opisane powyżej fakty stwierdzam, że w aktualnym stanie rozprawa doktorska mgr Magdaleny Skólmowskiej pt: „Enzymosomy antyoksydacyjne - otrzymywanie, badanie właściwości oraz możliwości wykorzystania w przechowywaniu nasienia knurów” **nie spełnia wymagań stawianych pracom doktorskim**, głównie (choć nie jedynie) ze względu na brak istotnych wyników naukowych. Wydaje się, że oceniana dysertacja może być jedynie dobrym punktem wyjściowym do przeprowadzenia kluczowych eksperymentów funkcjonalnych. Tak uzupełniona praca mogła by być w przyszłości dopuszczona do dalszych etapów przewodu doktorskiego, jednakże pod warunkiem uzyskania nowatorskich i użytecznych wyników naukowych.

Prof. dr hab. Mariusz Olczak
Wydział Biotechnologii
Uniwersytet Wrocławski

