Dr hab. Anna Hallmann
Katedra i Zakład Biochemii Farmaceutycznej
Gdański Uniwersytet Medyczny

Gdańsk, 18.09.2023

Ocena rozprawy doktorskiej Pani mgr Jadwigi Gronczewskiej: „Izoenzymy dehydrogenazy mleczanowej (LDH) w plemnikach i tkankach ryb" przygotowanej pod kierunkiem promotora – prof. dr hab. Edwarda Skorkowskiego.

Przedstawiona mi do oceny praca dotyczy charakterystyki izoenzymów dehydrogenazy mleczanowej (LDH) w plemnikach i wybranych tkankach ryb. Praca składa się z streszczenia po polsku i po angielsku, wykazu trzech publikacji wchodzących w skład rozprawy i oświadczeń współautorów określających swój wkład w powstanie publikacji. Publikacje zostały sfinansowane ze źródeł zewnętrznych:

- European Commission EVK3-CT-2000-00025 Biological Effects of Environmental Pollution in Marine Coastal Ecosystems ('BEEP')
- KBN 127/E-335/SPUB-M/5.PR UE/DZ 174/2001-2003
- COST Association (Food and Agriculture COST Action FA 1205: AQUAGAMETE)

Streszczenie pracy zawiera wprowadzenie dotyczące ogólnej charakterystyki dehydrogenazy mleczanowej i bardziej szczegółowej u ryb. Następnie został postawiony cel rozprawy i streszczono prace wchodzące w jej skład. Taki układ rozprawy jest nietypowy i niekompletny. Praca powinna składać się owszem, ze streszczenia (od 1 do 2 stron) i celu, ale poza tym oczekiwałabym wstępu, materiałów i metod, następnie wyników i wniosków wyciągniętych z opublikowanych manuskryptów. Ze względu na nietypowy układ, tzn. umieszczenie tytułem wstępu ogólnego 5-stronicowego streszczenia, brakuje w tej części odnośników piśmiennictwa.

Dehydrogenaza mleczanowa (LDH) jest końcowym enzymem beztlenowej fazy glikolizy, katalizuje odwracalną reakcję przekształcania pirogronianu w mleczan, przy udziale zredukowanego dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADH) jako koenzymu. Pirogronian w warunkach tlenowych ulega całkowitemu utlenieniu, natomiast w warunkach beztlenowych jest redukowany do mleczanu. Praca dehydrogenazy mleczanowej umożliwia zatem reoksydację NADH i odtworzenie NAD^+, niezbędnego do podtrzymania procesu glikolizy i produkcji ATP. Niestety, już w pierwszym akapicie streszczenia pojawia się nieprecyzyjna informacja, sugerująca, iż w reakcji przekształcenia pirogronianu w mleczan przy udziale LDH bierze udział NAD^+. Doktorantka zapewne użyła skrótu myślowego, ponieważ NAD^+ powstaje w tej reakcji i jak później sama Doktorantka pisze: „reakcja jest bardzo istotna, gdyż zapewnia regenerację NAD".

U kręgowców, LDH jest tetramerem, którego podjednostki są kodowane przez geny LDH-A, LDH-B, LDH-C i LDH-D. Istnieje pięć różnych form LDH, z których każda składa się z czterech podjednostek. U ryb, różne kombinacje produktów białkowych podjednostek dehydrogenazy mleczanowej-A i podjednostek dehydrogenazy mleczanowej-B wytwarzanych z innego genu tworzą różne formy

enzymu. Niestety, w ogólnej charakterystyce LDH są wymienione tylko 3 geny kodujące dehydrogenazę, wydaje się zatem, że Doktorantka nie zaktualizowała wiedzy na temat genetyki LDH.

W dalszej części streszczenia, Doktorantka charakteryzuje budowę i metabolizm rybich plemników oraz opisuje jeden toksyczny związek, tributylocynę – obecną w środowisku wodnym, wpływającą niekorzystnie na ruchliwość i żywotność plemników. Ta część streszczenia nie jest zaopatrzona w referencje, a informacja o stosowaniu tributylocyny w farbach przeciwporostowych do malowania kadłubów łodzi, statków, itp. wydaje się pochodzić z ubiegłego wieku. Faktycznie, historycznie tributylcyna (TBT) była szeroko stosowana jako składnik farb przeciwporostowych w przemyśle morskim. Jednak, w 2001 roku Międzynarodowa Organizacja Morska (IMO), a w 2003 roku Unia Europejska wprowadziły zakaz stosowania tego związku w ochronie kadłubów statków (IMO, 2001; Rozporządzenie WE, 2003). Skąd zatem przekonanie Doktorantki, iż tributylocyna jest nadal obecna w środowisku morskim?

Następnie, Doktorantka wraca w streszczeniu pracy do charakterystyki plemników (w domyśle, plemników rybich), które do odpowiedniego funkcjonowania wymagają dopływu energii w postaci ATP. Doktorantka wykazuje, że za ten proces odpowiada (za miarę magazynowania energii w puli nukleotydów adeninowych) ładunek adenylanów AEC i przytacza wyliczony ładunek dla komórek somatycznych 0,8 do 0,95. Czy nie powinien się tu znaleźć parametr dla plemników, zmierzony przez Doktorantkę i wykazany w plemnikach suma (AEC = 0,8)?

W streszczeniu pojawia się cel badań: **identyfikacja i izolacja izoenzymów LDH z plemników i innych tkanek wybranych gatunków ryb oraz wyznaczenie ich właściwości fizykochemicznych i katalitycznych, ponadto określenie wpływu TBT na aktywność LDH w plemnikach w porównaniu do tkanki somatycznej oraz wpływu metabolitów na bioenergetykę plemników na wybranym przykładzie.** Po nim, Doktorantka dokonuje streszczenia prac oryginalnych.

Pierwsza z publikacji to "**Enzyme activities in fish spermatozoa with focus on lactate dehydrogenase isoenzymes from herring *Clupea harengus***" Gronczewska J., Ziętara M.S., Biegniewska A., Skorkowski E.F., 2003 Comparative Biochemistry and Physiology Part B 134: 399-406, IF - 1,579 (2003), MNiSW – 30

W manuskrypcie oznaczono aktywności LDH, MDH, IDH, ME oraz G-6-PDH w plemnikach śledzia (*Clupea harrengus*) jako przedstawiciela gatunku słonowodnego oraz karpia (*Cyprinus carpio*) i suma afrykańskiego (*Clarias gariepinus*), reprezentujących środowisko słodkowodne. Uzyskane wyniki wykazały, że aktywność LDH w plemnikach śledzia była niska, a w plemnikach suma i karpia była około 10 i 14 razy wyższa. Natomiast aktywność innych enzymów (CK, MDH, IDH, ME i G-6-PDH) była wyższa w plemnikach śledzia niż w plemnikach karpia i suma.

W celu identyfikacji izoenzymów LDH w różnych tkankach śledzia zastosowano poziomą elektroforezę w 14% żelu skrobiowym przeprowadzoną w warunkach natywnych. Wykazano obecność dwóch izoenzymów LDH-B_4 i LDH-A_2B_2 w sercu i plemnikach śledzi oraz LDH-A_4 w mięśniach śledzi. W celu oczyszczenia i zagęszczenia obu izoenzymów LDH z plemników śledzia zastosowano złoże 5'-AMP-Sepharose 4B, a następnie DEAE-Sepharose. Analizę czystości otrzymanych preparatów wykonano za pomocą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym (PAGE), która wykazała obecność pojedynczych prążków we wszystkich oczyszczonych formach izoenzymów. Dla otrzymanych ze śledzia izoenzymów określono właściwości kinetyczne. Badania wykazały największe podobieństwo między izoenzymami LDH-A_2B_2 i LDH-B_4. Izoenzym LDH-A_2B_2 wykazał najwyższe powinowactwo do pirogronianu, LDH-B_4 pośrednie, a najniższe izoenzym LDH-A_4. Podobnie hamowanie reakcji przez

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY ul. M. Skłodowskiej-Curie 3a, 80-210 Gdańsk | +48 58 349 11 11 | info@gumed.edu.pl

wysokie stężenie pirogronianu było wyższe w przypadku LDH-A_2B_2, a najniższe dla izoenzymu LDH-A_4. Wyniki pomiaru termostabilności przeprowadzone dla poszczególnych izoenzymów, wskazały izoenzym LDH-A_4 jako najbardziej termolabilny, a największą termostabilność osiągnął izoenzym LDH-B_4 tracąc aktywność powyżej 70°C .

Mimo, że publikacja przeszła przez sito redakcyjne i została opublikowana, mam wątpliwości dotyczące metodyki i wyników. W opisie pobierania materiału widnieje informacja, iż tkanki i plemniki pochodzące z ryb były podzielone, część materiału zamrożono, część używano na świeżo. Nigdzie w pracy nie określono, na jakim materiale pracowano, czy na świeżym czy zamrożonym. Z publikacji innych naukowców wynika, że już po 9 dniach przechowywania rybich plemników w zamrażarce (-80°C) aktywność enzymatyczna LDH spada 3-krotnie (Aramli et al. 2015). Nie ma w pracy żadnej wzmianki, czy były różnice w aktywnościach badanych enzymów i wrażliwości na substraty w tkankach somatycznych jak i w plemnikach, świeżych jak i mrożonych w ciekłym azocie.

W tej publikacji, Doktorantka wykonała samodzielnie większość analiz, poza pomiarem aktywności enzymatycznych, wydaje się więc, że jest wiodącym autorem tej pracy.

Druga z publikacji to **„Lactate dehydrogenase in fish spermatozoa and its role in sperm cell bioenergetics."** Gronczewska J., Skorkowski E.F., 2020 Indian Journal of Experimental Biology 58: 7-13 IF 2 – 0,818 (2020), IF 5 – 1,006 (2020), MNiSW - 70

Praca została opublikowana w 2020 roku, 17 lat po pierwszej. W tej pracy opisano dehydrogenazę mleczanową w plemnikach i tkankach somatycznych trzech gatunków ryb w celu określenia jej roli w bioenergetyce plemników w warunkach normalnych i w obecności zanieczyszczeń takich jak tributylocyna. Zmierzono również w tych samych warunkach ładunek energetyczny adenylanów w plemnikach suma (AEC). U śledzia potwierdzono obecność izoenzymu LDH-B_4 w plemnikach, sercu, oku i wątrobie oraz izoenzymu LDH-A_4 w mięśniu szkieletowym, wątrobie oraz niewielką aktywność tej izoformy w sercu i oku. U karpia, stwierdzono, iż w większości tkanek wzór elektroforetyczny LDH składał się maksymalnie z dziewięciu izoenzymów, zaś liczba izoenzymów LDH w plemnikach przypominała liczbę tych izoform w oku. Natomiast jeden izoenzym LDH-B_4 obecny w plemnikach suma wykazywał podobną ekspresję w wątrobie i sercu.

Następnie oznaczono ładunek energetyczny adenylanów tylko dla plemników suma afrykańskiego (*Clarias gariepinus*) i określono wpływ substratów energetycznych na AEC. Najwyższy ładunek stwierdzono w obecności pirogronianu i mleczanu (bezpośrednich substratów dla LDH, AOC = 0,7) a najniższy w obecności samej glicyny (AEC=0,009). W dalszej części pracy określono wpływ tributylocyny na aktywność LDH-B_4 w plemnikach śledzia i karpia. Wykazano silniejszy hamujący wpływ TBT na LDH w plemnikach śledzia w porównaniu do plemników karpia.

Ta publikacja również została zaakceptowana przez edytora czasopisma, mimo, że posiada wg mnie braki i luki w dyskusji. W materiałach i metodach jest opisany sposób uzyskania próbek rybiej spermy i tkanek. Jest to prawie ta sama grupa zwierząt, jaka została opisana w publikacji 1. Prawie, ponieważ, w tej pracy nie ma dat poboru lub przetransportowania próbek. Jedyne, co uzyskujemy, to informację, iż sumy i karpie pochodziły z Uniwersytetu Katolickiego z Leven, zaś śledzie pochodziły od lokalnego rybaka, i były złowione w sezonie rozrodczym. Podanie daty poboru rybich tkanek to wg mnie ważna informacja, ze względu na rok publikacji wyników - 2020. Czy analizy enzymatyczne były prowadzone współcześnie, ale na materiale dostarczonym w 2001-2002 roku? Czy badania prowadzono w 2002? Czy może wyżej opisane tkanki były dostarczone w 2019 roku? Nie ma tu jasnej odpowiedzi. Jest to istotne z punktu badania aktywności enzymatycznej i zawartości nukleotydów

purynowych. Jeżeli oznaczono stężenia nukleotydów, zwłaszcza w plemnikach, to musiał być to materiał świeży, a nie leżący 17 lat w zamrażarce.

Kolejna rzecz, która zwraca moją uwagę, to brak wyników stężeń ATP, ADP i AMP. W pracy jest dokładnie opisana metodyka pomiaru nukleotydów purynowych, jednak nie ma wyników uzyskanych tą metodą. Widnieje oczywiście końcowe przeliczenie i przedstawienie wartości AEC. Dodatkową lukę, którą stwierdzam, to fakt, że pomiar stężenia nukleotydów przeprowadzono tylko w plemnikach suma. Dlaczego nie ma w pracy wyników dla śledzia i karpia?

W tej publikacji, Doktorantka przyznaje, że pozyskała materiał tylko ze śledzia i wykonała doświadczenia z izolowanej z plemników śledzia LDH. Oznacza to mniejszy udział Doktorantki w powstaniu pracy, zawężony do badań nad śledziem.

Trzecia, ostatnia praca, wchodząca w skład rozprawy doktorskiej to „**Inhibition by tributyltin of herring skeletal muscle lactate dehydrogenase activity.**" Gronczewska J., Biegniewska A., Ziętara M.S., Skorkowski E.F., 2004. Comparative Biochemistry and Physiology Part C 137: 307-311 IF - 1,651 (2004), MNiSW – 30.

W tej pracy zbadano aktywność izoformy LDH-A_4 z mięśnia szkieletowego śledzia (*Clupea harengus*) w obecności chlorku tributylocyny (TBT). W artykule opisano zależne od stężenia TBT hamowanie *in vitro* aktywności LDH. Proces ten był odwracalny w obecności wysokiego stężenia albuminy bydlęcej (BSA).

Praca pochodzi z 2004 roku, więc wydaje się być dalszym ciągiem pracy opublikowanej w 2003 roku, bo dotyczy charakterystyki tylko izoformy mięśniowej LDH śledzia. Według mnie do całości brakuje charakterystyki mięśniowej izoformy LDH (w obecności TBT) pozostałych badanych wcześniej ryb – karpia i suma. W tej pracy nie znalazłam również informacji, z jakiego roku czy sezonu pochodziły osobniki śledzia bałtyckiego. W tej publikacji, Doktorantka pozyskała materiał do badań i wykonała większość analiz, więc wydaje się, że jest wiodącym autorem tej pracy.

Doktorantka podsumowała rozprawę następująco: wyniki omówione w pracach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej rzucają więcej światła dla lepszego zrozumienia funkcji LDH w plemnikach i tkankach ryb i jego roli w metabolizmie komórki.

1. Izoenzymy LDH-A_2B_2 i LDH-B_4 obecne w plemnikach śledzia, zaś LDH-B_4 w plemnikach suma potwierdzają lepsze przystosowanie do warunków tlenowego metabolizmu tych komórek.
2. LDH-A_4 z mięśnia śledzia jest najbardziej hamowanym izoenzymem przez TBT.
3. Oba substraty reakcji LDH (pirogronian i mleczan) najwydajniej utrzymują ładunek energetyczny adenylanów (AEC) w plemnikach suma w zakresie wartości fizjologicznych.

Moje podsumowanie.

Zbiór załączonych przez Doktorantkę publikacji miał zawierać wyczerpujące informacje dotyczące „**Izoenzymów dehydrogenazy mleczanowej (LDH) w plemnikach i tkankach ryb**". Moim zdaniem, wyniki zaprezentowane w publikacjach nie są wystarczające, aby wyczerpywały zarówno temat, jak i cel rozprawy. Z mojej analizy wynika, że Doktorantka najlepiej scharakteryzowała izoenzymy występujące w tkankach somatycznych i plemnikach śledzia *Clupea harengus* i tak powinien brzmieć tytuł rozprawy. Poniżej załączam tabelę, w której porównuję uzyskane rezultaty z analiz prowadzonych na trzech gatunkach ryb (opublikowane dane). Widoczne są luki w wielu

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY ul. M. Skłodowskiej-Curie 3a, 80-210 Gdańsk | +48 58 349 11 11 | info@gumed.edu.pl

analizowanych parametrach. Brak wyników uzyskanych z pozostałych ryb (słodkowodnych) uniemożliwia wyciągnięcie poprawnych wniosków porównawczych. Myślę, że Doktorantka zdawała sobie sprawę z tych braków i miała szansę przedstawić brakujące wyniki w pracy opublikowanej 16 lat po dwóch pierwszych pracach. Niestety, przedstawione tam rezultaty badań tylko fragmentarycznie uzupełniają luki. Brakuje w tej publikacji innych nowoczesnych rozwiązań metodycznych np. klonowanie molekularne, czy wykazanie tkankowej ekspresji LDH przy użyciu przeciwciał fluorescencyjnych.

	Izoenzymy: izolacja, elektroforeza	Aktywność enzymatyczna - plemniki	Kinetyka LDH	Profil inaktywacji cieplnej	Ładunek energetyczny adenylanów (AEC)	Wpływ pH na profil izolowanych izoenzymów	Hamowanie LDH przez TBT
Śledź	LDH-B_4 i LDH-A_2B_2 w sercu i plemnikach oraz LDH-A_4 w mięśniach	LDH, CK, MDH, IDH, ME, G-6-PDH	LDH-A_4, LDH-B_4 i LDH-A_2B_2 w tkankach i plemnikach	LDH-A_4, LDH-B_4 i LDH-A_2B_2 w tkankach i plemnikach	-	W mięśniu i plemnikach	LDH-B_4 - plemniki, LDH-A_4 – mięśnie (+ w obecności pirogronianu i albuminy)
Sum	LDH-B_4 obecny w plemnikach, w wątrobie i sercu, dodatkowo w sercu pięć izoenzymów - produktów genów LDH-A i LDH-B.	LDH, CK, MDH, IDH, ME, G-6-PDH	-	-	Zmierzono w obecności różnych substratów energetycznych w plemnikach	-	-
Karp	LDH - 9 izoenzymów, liczba izoenzymów LDH w plemnikach przypominała ekspresję w oku.	LDH, CK, MDH, IDH, ME, G-6-PDH	-	-	-	-	LDH - plemniki

Streszczenie, które miało być wprowadzeniem do uzyskanych przez Doktorantkę wyników, nie spełnia swojej funkcji. Zawiera nieścisłości, ogólniki i nie jest zaktualizowane. Brak piśmiennictwa nie pozwala czytającemu odnaleźć się w czasie. Nie wiem, czy autorka opisuje aktualną wiedzę na temat LDH i TBT czy raczej wiedzę dostępną 20 lat temu. Również podsumowanie rozprawy jest pobieżne, oczekiwałam analizy porównawczej, chociażby w oparciu o dane z innych dostępnych publikacji.

Rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną oraz wykazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez Doktorantkę, jednak nie stanowi oryginalnego rozwiązania problemu naukowego z powodu stwierdzonych licznych braków.

Wniosek końcowy

Przedstawiona rozprawa doktorska, według mnie, nie spełnia wymogów określonych w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2003 Nr 65 poz.595 z póź. zm.), w zw. z art. 179, Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1669 z póź. zm.). i wnoszę o niedopuszczenie Doktorantki do publicznej obrony.

Piśmiennictwo: Aramli MS, Kalbassi MR, Nazari RM. 2015. Spermatozoa and seminal plasma enzyme activity in Persian sturgeon, *Acipenser persicus*, in relation to short-term storage. Aquaculture Research, 46:8, 2037-2042.

Anna Hallmann

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY ul. M. Skłodowskiej-Curie 3a, 80-210 Gdańsk | +48 58 349 11 11 | info@gumed.edu.pl