

**Recenzja**  
**rozprawy doktorskiej mgra Karola Ciemińskiego**  
**pt. „Molekularny mechanizm ochronnego działania treningu pływackiego na mięśnie szkieletowe w mysim modelu ludzkiej choroby stwardnienia zanikowego bocznego”**

Rola aktywności fizycznej w patologii stwardnienia zanikowego bocznego (ALS) nie jest jednoznaczna. Niektóre badania epidemiologiczne sugerują, że ciężkie i długotrwałe ćwiczenia fizyczne indukujące stres oksydacyjny oraz stan zapalny mogą zwiększać ryzyko rozwoju choroby, podczas gdy umiarkowany trening (np. pływacki) może działać neuroprotekcynie i opóźniać jej wystąpienie.

Badania stanowiące przedmiot przedłożonej do oceny rozprawy doktorskiej są ukierunkowane na określenie molekularnych mechanizmów związanych z ochronnym działaniem treningu pływackiego u transgenicznych myszy w mysim modelu ludzkiej choroby stwardnienia zanikowego bocznego.

**Przesłanki formalne**

Recenzja została sporządzona w oparciu o uchwałę nr 367/V/2023 Rady Naukowej Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu z dnia 9 maja 2023 roku (zgodnie z art. 190 ust. 3 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce*, Dz.U. z 2022 r. poz. 574 ze zm.).

**Struktura pracy**

Dysertacja doktorska, którą otrzymałam do recenzji, oprócz 8. głównych rozdziałów zawiera dane o kandydacie, wykaz używanych skrótów, streszczenia w języku polskim i angielskim oraz załączniki obejmujące oświadczenia i publikacje. Całość stanowi 75. stron maszynopisu.

Zgodnie z zamieszczoną przez Autora informacją, praca doktorska została przygotowana jako cykl prac składający się z dwóch publikacji naukowych o łącznej punktacji **MEiN = 280 i IF = 11,204**:

- **Ciemiński K. i wsp.** Swim training affects Akt signaling and ameliorates loss of skeletal muscle mass in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Scientific Reports* 2021, 11:20899,
- **Ciemiński K. i wsp.** Swim training affects on muscle lactate metabolism, nicotinamide adenine dinucleotides concentration, and the activity of NADH shuttle enzymes in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, 23(19): 11504.

Wkład Doktoranta w powstanie ww. prac polegał m.in. na koncepcji, zaprojektowaniu i realizowaniu badań, analizie uzyskanych danych oraz napisaniu oryginału manuskryptu.

### **Ocena treści**

Część przeglądowa („*Wstęp*”) została podzielona na pięć podrozdziałów. W pierwszym z nich, Autor opisał aktualny stan wiedzy na temat etiologii schorzenia jakim jest stwardnienie zanikowe boczne. Przedstawił również eksperymentalne modele zwierzęce wykorzystywane w badaniach nad ALS. W kolejnych dwóch podrozdziałach omówił metody farmakologicznego leczenia ALS oraz znaczenie regularnej aktywności fizycznej w łagodzeniu objawów tej choroby. W podrozdziale trzecim Autor wyjaśnił, odnosząc się do danych prezentowanych w literaturze, znaczenie treningu pływackiego w ALS. W kolejnym podrozdziale szczegółowo opisał rolę wewnątrzkomórkowego szlaku sygnałowego serynowo-treoninowej kinazy Akt w różnicowaniu neuronów ruchowych, regenerowaniu i atrofii mięśni, uzasadniając przy tym potrzebę prowadzenia badań nad wpływem treningu pływackiego na przebieg tego szlaku u zwierząt doświadczalnych z ALS. W ostatnim, piątym podrozdziale opisał zmiany metaboliczne towarzyszące ALS, podkreślając znaczenie dostępności dinukleotydów nikotynoamidoadeninowych w przebiegu tej choroby.

Podsumowując „*Wstęp*” jest starannie opracowaną przeglądowną częścią dysertacji, świadcząca o szerokiej wiedzy i zrozumieniu bardzo trudnej tematyki. Jego układ jest podporządkowany przedstawionym celom badań.

W rozdziale drugim „*Cele i hipotezy*” Autor precyzyjnie sformułował podstawowy cel pracy oraz cztery hipotezy badawcze.

Autor w większości rzetelnie opracował rozdział „*Material i metody badawcze*”. Badania zostały przeprowadzone na modelu zwierzęcym z wykorzystaniem transgenicznych samców mysich B6SJL-Tg (SOD1G93A) 1 Gur/J z mutacją SOD1G93A (mysi model ludzkiej choroby ALS, n=35) oraz samców mysich B6SJL typu dzikiego (n=7). Po okresie aklimatyzacji zwierzęta zostały losowo przydzielone do następujących grup: ALS BEFORE – myszy nietrenowane z ALS bez widocznych objawów choroby, ALS ONEST -nietrenowane i trenowane z ALS z pierwszymi objawami choroby, ALS TERMINAL – nietrenowane i trenowane z ALS w ostatnim stadium choroby i grupy kontrolnej - samce mysie typu dzikiego (WT). W celu ustalenia stopnia zaawansowania choroby wykorzystano odpowiedni test oceny klinicznej. Następnie podaje punkty czasowe, w których były uśmiercane zwierzęta. Procedura treningowa (5 razy w tygodniu po 30 min. z wprowadzoną modyfikacją protokołu od 105. dnia życia) w basenie z regulowanym przepływem wody rozpoczynała się od 70. dnia życia i trwała do 115. dnia życia.

Zamienne używanie „*tygodni*” i „*dni*” dla określenia czasu trwania życia badanych zwierząt powoduje pewien dysonans w zrozumieniu tej części metodologii. Poza tym, z korzyścią dla przedstawionego protokołu badań byłoby wyjaśnienie, dlaczego trening pływacki rozpoczynał się od 70. dnia życia, czyli wtedy, kiedy zwierzęta z grupy nietrenowanych z ALS bez widocznych objawów choroby oraz myszy typu dzikiego były uśmiercane?

W rozdziale „*Material i metody badawcze*” Autor klarownie opisał metody badawcze obejmujące między innymi pobranie krwi, homogenizację tkanek i przygotowanie lizatów, western blotting, analizę proteomiczną wykonaną za pomocą chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas oraz metodę separacji magnetycznej i cytometrii przepływowej. Umożliwiły mu one dokonanie pomiaru stężenia wybranych białek szlaku sygnałowego, aktywności kinazy kreatynowej, dehydrogenazy jabłczanowej i mleczanowej, stężenia mleczanu i dinukleotydów nikotynoamidoadeninowych.

Analizy statystyczne wykorzystane do opracowania zmiennych prezentowanych w pracach nie budzą zastrzeżeń.

W kolejnym rozdziale zatytułowanym „*Wyniki*” omówił rezultaty badań przedstawione w pracach stanowiących dysertację doktorską. Uzyskane wyniki są interesujące pod względem poznawczym oraz aplikacyjnym. Do oryginalnych i ważnych osiągnięć naukowych Doktoranta należy niewątpliwie wykazanie, że:

- trening pływacki ogranicza redukcję masy mięśniowej u zwierząt ze stwierdzoną chorobą ALS,
- stwardnienie zanikowe boczne wpływa na sygnalizację szlaku Akt w części odpowiadającej za atrofię komórek mięśniowych, natomiast trening pływacki może częściowo odwracać te zmiany,
- rozwojowi ALS towarzyszą zaburzenia w stężeniu mleczanu i puli dinukleotydów nikotynoamidoadeninowych, obniżenie poziomu białek transportujących mleczan (MCT1) oraz zmniejszenie aktywności dehydrogenazy mleczanowej w mięśniu piszczelowym przednim,
- trening pływacki częściowo kompensuje zmiany w stężeniu LA, modyfikuje aktywność dehydrogenazy mleczanowej, ponadto nie wpływa na poziom transporterów mleczanu oraz stężenia koenzymów NAD<sup>+</sup> i NADH.

„Dyskusja” wyników uzyskanych w toku badań podsumowanych w rozprawie została przeprowadzona logicznie i kompetentnie. Autor wysunął kilka własnych, interesujących hipotez dotyczących wpływu treningu pływackiego na badane przez niego czynniki (szlak sygnalizacji Akt i metabolizm mleczanu) u transgenicznych myszy z początkującym i zaawansowanym stadium ALS. Autor zwrócił m.in. uwagę na rolę IGF-1 w mięśniach szkieletowych podczas rozwoju stwardnienia zanikowego bocznego. Zwiększone stężenie IGF-1, obserwowane wraz z rozwojem ALS, może wskazywać na jego ochronny wpływ na mięśnie szkieletowe. Ponadto, przedyskutował w oparciu o wyniki badań własnych i dostępną literaturę, wyniki dotyczące szlaku sygnałowego Akt w hipertrofii i atrofii mięśni szkieletowych. W opinii Autora zwiększone, po treningu pływackim, całkowite stężenie białka Akt oraz hamowanie części ścieżki sygnalizacyjnej Akt odpowiedzialnej za indukcję proteolizy białek mięśniowych u zwierząt z objawami ALS może wskazywać na ważną rolę takiej formy aktywności fizycznej w zapobieganiu atrofii mięśni szkieletowych. Jednak, jak podkreśla, wymagane są dalsze badania w tym zakresie. W dalszej części dyskusji Autor omówił wyniki badań dotyczące wpływu treningu pływackiego na wybrane wskaźniki somatyczne (masa ciała i masa mięśniowa) badanych zwierząt oraz aktywność kinazy kreatynowej. Następnie przedyskutował wyniki związane z metabolizmem mleczanu oraz jego transportem do krwiobiegu lub komórek mięśniowych. Analiza tych wskaźników potwierdziła nieliczne dane innych autorów, że trening pływacki może wpływać na usuwanie mleczanu z mięśni szkieletowych u zwierząt z ALS. Nowum badań przedstawionych w rozprawie doktorskiej stanowi wykazanie rozbieżności pomiędzy zwiększoną kumulacją mleczanu w mięśniach szkieletowych i jednocześnie obniżoną aktywnością dehydrogenazy mleczanowej. Uzyskane

wyniki skłoniły Autora do znalezienia przyczyny zaobserwowanego zjawiska. W tym celu zbadał stężenia dinukleotydów nikotynoamidoadeninowych (NAD<sup>+</sup>, NADH i ich sumy) i wykazał, że niższy poziom tych koenzymów u zwierząt z ALS może być związany ze zmniejszoną aktywnością enzymów glikolitycznych. Trening pływacki nie wpływa jednak na ich stężenie. Akapit kończący „Dyskusję” utwierdza w przekonaniu, że Autor jest świadomym badaczem, znającym ograniczenia swoich badań.

Dysertację kończy krótki rozdział „Wnioski” i „Piśmiennictwo”. Przedstawione wnioski stanowią odpowiedź na postawione przez Autora hipotezy badawcze.

Reasumując stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska Pana mgra Karola Ciemińskiego pt. „*Molekularny mechanizm ochronnego działania treningu pływackiego na mięśnie szkieletowe w mysim modelu ludzkiej choroby stwardnienia zanikowego bocznego*”, przygotowana pod opieką naukową prof. dr hab. Wiesława Ziółkowskiego i dra Damiana Flisa jest niewątpliwie wartościowym osiągnięciem naukowym i spełnia wymogi stawiane pracom promocyjnym na stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauk o kulturze fizycznej.

**W związku z powyższym, z pełnym przekonaniem przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu wnioski o dopuszczenie Pana mgra Karola Ciemińskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Ewa Sadowska-Kiepa