

Prof. dr hab. n. med. Joanna Majerczak
Katedra Fizjologii Wysiłku i Bioenergetyki Mięśni
Wydział Nauk o Zdrowiu
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

Kraków, 21. 08. 2023 r.

RECENZJA PRACY DOKTORSKIEJ

mgr Karola Ciemińskiego

pt.: „Molekularny mechanizm ochronnego działania treningu pływackiego na mięśnie szkieletowe w mysim modelu ludzkiej choroby stwardnienia zanikowego bocznego”

Rozprawa doktorska mgr Karola Ciemińskiego ma charakter eksperymentalny, a tworzą ją dwie publikacje powiązane ze sobą tematycznie, z których pierwsza ukazała się w czasopiśmie *Scientific Reports* (wydawnictwo Springer), a druga w *International Journal of Molecular Sciences* (wydawnictwo MDPI). Łączny **impact factor** tych publikacji, zgodnie z przedłożoną dokumentacją wynosi **11.204**, a liczba punktów **MEIN** wynosi **280**.

Poza dwoma publikacjami, wchodzącymi w skład rozprawy doktorskiej, mgr Karol Ciemiński jest współautorem czterech publikacji zamieszczonych w czasopismach indeksowanych w JCR (2 w *International Journal of Molecular Sciences* oraz 2 w *Baltic Journal of Health and Physical Activity*), jak i dwóch publikacji zamieszczonych w czasopiśmie *Trends in Sports Sciences* (spoza JCR). Wskaźnik Hirscha (według Web of Science) doktoranta wynosi obecnie 3. Publikacje włączone do cyklu powstały w ramach prac zespołu pod kierunkiem prof. dr hab. Wiesława Ziółkowskiego (Gdański Uniwersytet Medyczny, Pracownia Regeneracji Mięśni, Klinika Rehabilitacji Medycznej) a doktorant uczestniczył zarówno w tworzeniu koncepcji pracy, badaniach jak i powstawaniu obu manuskryptów (patrz poniżej).

Uwagi ogólne

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska mgr Karola Ciemińskiego ma typowy układ przewidziany dla tematycznie powiązanych publikacji, zawiera wstęp, rozdział materiał i metody, omówienie publikacji wchodzących w skład cyklu wraz z piśmiennictwem (82 pozycje), wnioski oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. Do pracy dołączono kopie omawianych publikacji oraz oświadczenia współautorów o ich udziale w powstaniu ww. publikacji.

Celem pracy była próba wyjaśnienia mechanizmu związanego z ochronnym działaniem treningu w formie pływania na mięśnie szkieletowe w mysim modelu stwardnienia zanikowego bocznego (ALS). Stwardnienie boczne zanikowe jest nieuleczalną chorobą neurodegeneracyjną, która cechuje się selektywną śmiercią motoneuronów (w korze ruchowej, pniu mózgu i rdzeniu kręgowym) co prowadzi do obniżenia napięcia mięśniowego, atrofii mięśniowej i m.in. zaburzeń mowy jak i trudności w przełykaniu. Śmierć następuje w wyniku niewydolności mięśni oddechowych. Choroba występuje w

Sekcja Nauki

L. dz. 12. Rk. 193/2023

Wpł. dnia 24. VIII. 2023

dwóch postaciach tj. sporadycznej (90% przypadków, sALS) o nieznannej etiologii oraz i genetycznie uwarunkowanej (fALS). W związku z tym, że choroba prowadzi do atrofii mięśniowej i jej konsekwencji (ze śmiercią włącznie) badanie patomechanizmu atrofii w ALS z uwzględnieniem szlaków sygnalizacyjnych odpowiedzialnych za syntezę i rozpad białek w mięśniach, wydają się być kluczowe w terapii pacjentów z ALS.

W publikacjach wchodzących w skład cyklu (n=2) doktorant był pierwszym autorem. Wkład mgr Karola Ciemińskiego polegał na udziale w stworzeniu koncepcji pracy i zaprojektowaniu badań (wraz z dr D. Flisem, prof. W. Ziółkowskim), udziale w realizacji badań, gromadzeniu i analizie wyników badań, przygotowaniu rycin i tabel, udziale w opracowaniu oryginalnego tekstu publikacji (*writing original draft*). W **publikacji 1** doktorant podjął próbę przedstawienia znaczenia kluczowego szlaku sygnalizacyjnego regulującego obrót białka w mięśniach tj. szlaku IGF-1/Akt i odpowiedzi na pytanie w jaki sposób trening w formie pływania u myszy ALS wpłynie na tempo atrofii mięśni w tej chorobie. Z kolei w **publikacji 2** przedstawiono znaczenie treningu w formie pływania na metabolizm mleczanu w ALS.

Wstęp rozprawy doktorskiej

We wstępie doktorant przedstawił podłoże choroby ALS, jej wpływ na funkcjonowanie pacjentów oraz scharakteryzował modele badawcze stosowane obecnie w badaniu patomechanizmu tej choroby. Opisał znaczenie szlaku sygnalizacyjnego Akt odpowiadającego za obrót białkiem w mięśniach szkieletowych (hipertrofia/regeneracja oraz degradacja). Podkreślił, że jak dotąd nie badano znaczenia treningu w formie pływania w kontekście szlaku Akt w mięśniach w ALS, co było celem **publikacji 1** (*Sci Rep* 2021). W kolejnym podrozdziale wstępu doktorant omówił tzw. „hipotezę mleczanową” jako jedno z funkcjonujących wyjaśnień patomechanizmu ALS. Podstawą tej hipotezy jest założenie, że związana z chorobą dysfunkcja łańcucha oddechowego prowadzi do zaburzenia ATP-zależnego czółenka mleczanowego (układu przenoszącego) w zakończeniu nerwowo-mięśniowym (ATP-dependent *muscle-neuronal lactate shuttle*, MNLS). Konsekwencją dysfunkcji czółenka MNLS jest akumulacja mleczanu w zakończeniu nerwowo-mięśniowym (płytkce ruchowej), która wpływa na zaburzenie neurotransmisji a w konsekwencji prowadzi do degeneracji i atrofii mięśni.

Metodyka rozprawy doktorskiej

W obu publikacjach materiał badawczy stanowiły myszy tj. myszy transgeniczne (samce myszy SOD1G93A, z ekspresją ludzkiego SOD1) (n=35 myszy, 5 grup po 7 myszy) i myszy kontrolne (WT, n=7). 45-dniowemu treningowi w formie pływania poddano myszy jedynie z grupy ALS. Myszy trenowano od 70 do 115 dnia życia tj. między 10-tym a ok. 16-tym tygodniem życia. Trening w formie pływania prowadzono początkowo 5 razy w tygodniu przez 5 tygodni po 30 minut, a w ostatnich 10 dniach trening ten było prowadzony 3 razy w tygodniu. Temperatura wody wynosiła 30°C, a maksymalna prędkość jej przepływu 5L/min. Czas jednostki treningowej i prędkość przepływu wody były dostosowywane do indywidualnych możliwości zwierząt. Po zakończeniu treningu myszy uśmiercano i pobierano krew i mięsień piszczelowy przedni (TA).

W pobranym mięśniu TA wykonano: a) analizę ekspresji białek szlaku Akt metodą Western immunoblotingu; b) analizę białek metodą separacji magnetycznej i cytometrii przepływowej; b) analizę

proteomiczną (LC-MS/MS) wybranych białek szlaku Akt; białek związanych z procesem glikolizy oraz enzymów wchodzących w skład czółenka jabłczanowo-asparaginowego oraz m.in. c) analizę stężeń mleczanu. Dodatkowo we krwi badano aktywność kinazy kreatynowej (publikacja 1) i stężenie mleczanu (publikacja 2).

Wyniki i Wnioski

Wyniki badań zaprezentowano w dwóch publikacjach wchodzących w skład cyklu (*vide* powyżej) i podsumowano w przedłożonej rozprawie doktorskiej (str. 25-27). Wyniki w przedłożonej rozprawie przedstawione są opisowo bez przywołania szczegółowych danych (ryciny) z obu publikacji.

Podsumowując w przedłożonej rozprawie wykazano m.in. że:

Publikacja 1: ALS wiąże się z a) obniżoną masą mięśniową; b) zaburzoną sygnalizacją zależną od insuliny tj. u myszy ALS w stadium terminalnym stwierdzono wyższe stężenie IGF-1 w porównaniu do myszy w początkowej fazie choroby c) z kolei analiza białek szlaku sygnałowego Akt wykazała brak zmian ekspresji Akt, brak różnic stosunku p-Akt/Akt pod wpływem choroby, jednakże wyższą ekspresję białek szlaku Akt odpowiedzialnych za proteolizę (degradację białek mięśniowych) tj. FOXO3a i MuRF-1.

Z kolei trening w formie pływania myszy z ALS: a) zmniejszył tempo spadku masy mięśniowej w grupie zwierząt z ALS; b) nie wpłynął na ekspresję białek odpowiedzialnych za hipertrofię mięśni tj. nie zmienił ekspresji Akt oraz stosunku pAkt/Akt, mTOR i p70S6K; c) trening ten obniżył jednakże poziom białka FOX3a i MuRF-1-zatem przyczynił się do zmniejszenia tempa proteolizy białek mięśniowych wpływając w ten sposób hamująco na tempo degradacji mięśni w ALS.

Natomiast w **publikacji 2**, wykazano, że w ALS a) dochodzi do nagromadzenia mleczanu w mięśniach, któremu towarzyszy zmniejszone stężenie mleczanu we krwi i nie jest to związane ze zmianą ilości transporterów mleczanu (MLC1 i MLC4); b) co ciekawe aktywność w mięśniach LDH (enzymu odpowiedzialnego za metabolizm mleczanu) jest obniżona co nie wiąże się ze zmianą aktywności czółenka jabłczanowo-asparaginowego; b) trening w formie pływania nie zmienił ilości transporterów MCT1 i MCT4.

Uwagi szczegółowe

Rozprawa doktorska mgr Karola Ciemińskiego powstała pod kierunkiem prof. dr hab. Wiesława Ziółkowskiego (promotora) z udziałem dr Damiana Flisa (promotor pomocniczy), zespołu dla którego molekularny patomechanizm stwardnienia zanikowego bocznego (ALS) oraz wpływ treningu fizycznego na przebieg ALS stanowi jeden z podstawowych tematów badawczych. Na uwagę zasługuje fakt zastosowania w niniejszej rozprawie zaawansowanych metod analizy białek do oceny szlaku sygnalizacyjnego Akt, w tym zastosowanie chromatografii cieczowej połączonej ze spektrometrią mas (LC-MS/MS).

Z obowiązku Recenzenta pragnę zwrócić uwagę na następujące kwestie:

1. użyte w tytule pracy oraz w tekście pracy w języku polskim wyrażenie 'trening pływacki' jest niefortunne, sugeruje ono, według mnie, że mowa o treningu pływaka. W tym przypadku w

- odniesieniu do zwierząt należałoby użyć innego wyrażenia np. „trening w formie pływania” co byłoby bliższe użytemu w tytule i w tekście publikacji 1 i 2 wyrażeniu „swim training”;
2. w rozdziale Wyniki (str. 25) oraz w publikacji 1 i 2 brakuje danych dotyczących ilościowego przedstawienia wykonanego treningu. Doktorant powinien przedstawić wyniki podstawowych parametrów opisujących zastosowany trening tj. np. całkowity dystans i czas treningu (w ciągu 45 dni) w grupie ALS onset i ALS terminal. Dane te pozwoliłyby na porównanie obu grup (ALS onset i ALS terminal) w kontekście aktywności fizycznej i ewentualne odniesienie tych różnic do zmian morfologicznych (w mięśniu TA) i zmian w poziomie ekspresji białek szlaku Akt i innych mierzonych parametrów. Zgodnie z opisem metodyki treningu (*Sci Rep*, Swim training protocol, strona 55) czas jednostki treningowej oraz prędkość przepływu wody były dostosowywane do indywidualnych możliwości myszy trenujących. Zatem trening ten (pomimo zapewne takiego założenia) nie był identyczny dla wszystkich trenujących myszy. Szczegółowe dane dotyczące treningu pozwoliłyby na skorelowanie wyników intensywności zastosowanego trening (łączny czas lub łączny dystans) z masą mięśniową, ekspresją białek szlaku Akt, stężeniem mleczanu itd.;
 3. we wstępie do rozprawy hipoteza mleczanowa jako hipoteza poddana badaniu w **publikacji 2** winna być lepiej przedstawiona. Sformułowanie (str. 13, paragraf 2) cytuję: „Mleczan jest uważany za produkt odpadowy glikolizy”, nawet z przywołaniem historycznej cytacji z 1890 roku (co doceniam) wymaga nieco szerszego wyjaśnienia jaką obecnie rolę w fizjologii/biochemii wysiłku pełni mleczan zaliczany do istotnych miokin/exerkin. Doktorant zarówno w rozprawie jak i w publikacji 2 cytuje prace G. Brooks’a, w których rola mleczanu nie tylko jako metabolitu glikolizy, ale i m.in. cząstki sygnalizacyjnej jest dobrze opisana. Dodatkowo należy wyjaśnić funkcjonowanie tzw. wewnątrzmięśniowego czółenka mleczanowego (*intramuscular lactate shuttle*) z uwzględnieniem znaczenia różnych typów włókien mięśniowych w produkcji i utlenianiu mleczanu. W tym kontekście rycina 2 przedstawiona we wstępie do rozprawy wymaga uzupełnienia/i lub wyjaśnienia;
 4. należy wziąć pod uwagę potencjalne skutki stresu wywołanego umieszczeniem zwierząt w wodzie tj. w obcym dla nich środowisku na stężenie mleczanu;
 5. dodatkowo wydaje się, iż w kolejnych badaniach np. do oceny różnic metabolizmu mleczanu we krwi i w mięśniach szkieletowych należałoby zaplanować dodatkowe grupy kontrolne tj. grupy trenujące zwierząt WT. Dane takie umożliwiłyby porównanie treningowych zmian w mleczanie we krwi i w mięśniach zarówno w grupie WT jak i ALS.

Drobne uwagi:

1. Sformułowanie „chorzy na ALS tracą siły” (str. 11, paragraf 1) winno być zastąpione sformułowaniem fizjologicznym podkreślającym wpływ choroby na siłę i moc mięśni.
2. Rycina 1, strona 14: sformułowanie ‘opracowanie własne’ winno być uzupełnione tj. np. „opracowanie własne na podstawie np. Schiaffino i Mammucari 2011, etc.”).
3. Rycina 2. Metabolizm mleczanu we krwi i w mięśniach szkieletowych powinien uwzględniać działanie wewnątrzmięśniowego czółenka mleczanowego (*vide* uwaga 3).

4. Przy opisie tzw. 'hipotezy mleczanowej' brakuje cytacji, stąd nie jest jasne, którą publikację doktorant miał na myśli opisując ww. hipotezę (str. 14). W publikacji 2 zacytowana jest w tym kontekście pozycja 19, tj. publikacja autorstwa Vadakkadath Meethal & Atwood (2012).

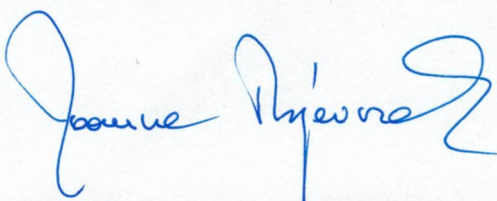
PODSUMOWANIE

Rozprawa doktorska mgr Karola Ciemińskiego „*Molekularny mechanizm ochronnego działania treningu pływackiego na mięśnie szkieletowe w mysim modelu ludzkiej choroby stwardnienia zanikowego bocznego*” stanowi próbę rozwiązania ważnego zagadnienia naukowego jakim jest poszukiwanie patomechanizmu ALS (znaczenie szlaku IGF-1/Akt) i ochronnego wpływu treningu fizycznego (pływanie) na mięśnie szkieletowe. Na uwagę zasługuje fakt zastosowania w niniejszej rozprawie zaawansowanych metod analizy białek (m.in. szlaku sygnalizacyjnego Akt), w tym chromatografii cieczowej połączonej ze spektrometrią mas (LC-MS/MS).

Głównym osiągnięciem naukowym przedłożonej rozprawy jest wykazanie ochronnego działania treningu w formie pływania na zmniejszenie tempa proteolizy białek (działanie poprzez szlak insulina/Akt/FOXO3a) w mięśniach szkieletowych w mysim modelu ALS.

Zarówno w aspekcie merytorycznym jak i redakcyjnym rozprawa mgr Karola Ciemińskiego spełnia kryteria i wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim (zgodnie Ustawą „o szkolnictwie wyższym i nauce” z dnia 20 lipca 2018 roku z późniejszymi zmianami) z dziedziny nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki o kulturze fizycznej dlatego wnioskuję do Rady Naukowej Akademii Wychowania Fizycznego im. Eugeniusza Piaseckiego w Poznaniu o dopuszczenie mgr Karola Ciemińskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, mając na uwadze walory poznawcze rozprawy doktorskiej jak i jej oryginalność wnioskuję o wyróżnienie przedłożonej rozprawy doktorskiej.



Prof. dr hab. n. med. Joanna Majerczak

Kraków, 21. 08. 2023 r.