

dr hab. Małgorzata Żychowska

Bydgoszcz, 20.07.2023

Uniwersytet Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy

Wydział Nauk o Zdrowiu i Kulturze Fizycznej

Katedra Biologicznych Podstaw Kultury Fizycznej

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Karola Ciemińskiego pt.: „Molekularne mechanizmy ochronnego działania treningu pływackiego na mięśnie szkieletowe w mysim modelu ludzkiej choroby stwardnienia zanikowego bocznego”, sporządzona na potrzeby postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, dyscyplinie nauki o kulturze fizycznej.

Aspekt formalny

Recenzja została sporządzona w związku z uchwałą Rady Naukowej AWF w Poznaniu nr 367/V/2023 z dnia 09.205.2023 roku. Recenzja została wykonana w oparciu o egzemplarz rozprawy doktorskiej wraz z załącznikami, przesłany w formie tradycyjnej.

1. Charakterystyka Kandydata

mgr Karol Ciemiński jest absolwentem AWFiS w Gdańsku, gdzie w roku 2015 uzyskał stopień magistra wychowania fizycznego. W tym samym roku podjął studia doktoranckie w AWFiS, które po złożeniu rezygnacji kontynuował od 2020 roku w AWF w Poznaniu. Obecnie Kandydat jest Prezesem i trenerem piłki siatkowej w UKS Gdyńska Akademia Siatkówki oraz nauczycielem wychowania fizycznego w Szkole Podstawowej nr 21 w Gdyni.

2. Układ pracy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska liczy łącznie 75 stron, przy czym pierwsze 35 stanowi opracowanie łącznie dwóch artykułów naukowych, a kolejne stanowią załączniki dołączone do pracy doktorskiej, tj. oświadczenia współautorów dotyczące ich wkładu w przygotowanie artykułów naukowych, będących podstawą do ubiegania się o nadanie stopnia doktora oraz wydruki oryginalnych artykułów naukowych. Początek dysertacji doktorskiej stanowią: spis treści, dane o kandydacie, wykaz skrótów, używanych w

Sekcja Nauki

L. dz. 20.07.2023

Wpł. dnia 26.07.2023 r.

opracowaniu, a także streszczenia pracy (sporządzone w j. polskim i j. angielskim). Rozdział nr 1 to zwięzły wstęp, w którym Doktorant wyróżnił 5 podrozdziałów dotyczących tematyki zawartej w pracy doktorskiej. Rozdział 2 zawiera cele pracy i 4 hipotezy badawcze. W rozdziale 3 zostały zestawione oryginalne artykuły naukowe, stanowiące podstawę przygotowanej dysertacji doktorskiej. W kolejnym, 4 rozdziale Doktorant zawarł opis materiałów i metod badawczych, rozdzielając go na metody wykorzystane w publikacji nr 1 oraz w publikacji nr 2. Podobnie (rozdział 5) zostały przedstawione wyniki badań. Rozdział 6 to dyskusja wyników badań, a kolejny zawiera 5 wniosków wynikających z przeprowadzonych badań. Na zakończenie tej części została przedstawiona literatura. Zastosowany układ pracy jest przejrzysty, czytelny, wielokrotnie sprawdzony w publikacji oryginalnych artykułów naukowych. W nienumerowanej części rozprawy, Doktorant zamieścił oświadczenia współautorów dotyczące ich udziału w pracach wykorzystanych do przygotowania niniejszej rozprawy, jak i wydruki artykułów oryginalnych.

3. Wartość naukowa i merytoryczna ocena rozprawy.

Rozprawa doktorska mgr. Karola Ciemińskiego została przygotowana pod opieką prof. dr hab. Wiesława Ziółkowskiego oraz dr Damiana Flisa, naukowców o znaczącym i uznanym dorobku naukowym, mających znaczny dorobek w zakresie wpływu aktywności ruchowej w ALS.

Podjęte przez Pana mgr. Karola Ciemińskiego badania zostały zebrane w 2 artykułach oryginalnych opublikowanych w czasopismach naukowych należących do grupy Q1: Scientific Reports (140 pkt MNiSW, IF=4,996) i w International Journal of Molecular Sciences (140 pkt MNiSW, IF=6,208). W obu Kandydat jest pierwszym autorem, mającym znaczny wkład w powstanie publikacji, co zostało potwierdzone stosownymi oświadczeniami. Łączna punktacja cyklu wynosi 280 pkt MNiSW (11,204 IF). Przedstawiony ciąg publikacji, stanowiący podstawę dysertacji doktorskiej, spełnia wymogi stawiane kandydatom do uzyskania stopnia naukowego doktora.

Przeprowadzony eksperyment, w którym Kandydat brał czynny udział, dotyczył wpływu stopnia zaawansowania ALS i treningu pływackiego na molekularne mechanizmy związane ze szlakiem sygnałowym Akt oraz metabolizmem mleczanu. Poszukiwanie metod spowolnienia rozwoju choroby stanowi bardzo ważny nurt badawczy, a wyjaśnienie mechanizmu ich oddziaływania to trudny i ambitny obszar działań naukowych, wymagających dużej wiedzy z zakresu biologii molekularnej, w tym znajomości wielu technik stosowanych do oznaczeń

białek. Oceniana rozprawa doktorska oparta została o wyniki badań przeprowadzonych na mysim modelu ludzkiej choroby ALS, co w mojej ocenie stanowiło dodatkową trudność dla absolwenta wychowania fizycznego, związaną z treningiem zwierząt, uśpieniem, preparowaniem tkanek (np. tkanki mięśniowej) itp.

Merytoryczna ocena rozprawy doktorskiej opartej o opublikowane oryginalne artykuły naukowe, wydane w liczących się czasopismach naukowych, jest ułatwiona z racji ich wcześniejszego recenzowania na etapie wydawniczym. Jednak zbiorcze opracowanie ciągu 2 publikacji naukowych, wykazanie ich spójności i logicznej konsekwencji kontynuowanych badań wymagało od Pana mgr. bardzo dobrej znajomości tematyki badawczej.

W części wstępnej Doktorant przedstawił istotę choroby, jej etiologię oraz modele badawcze. Zwrócił uwagę na potrzebę ciągłego poszukiwania molekularnych mechanizmów oraz genetycznych uwarunkowań choroby, w tym poszukiwanie tzw. genów markerowych. Dla przykładu, mutacja w genie *SOD1* wiąże się ze ryzykiem dziedziczenia ALS (co 5 chorych u którego diagnozuje się ALS posiada tę mutację). Wywołanie mutacji w *SOD1* u zwierząt doświadczalnych pozwoliło na wyselekcjonowanie mysiego modelu choroby (myszy *SOD1G93A*), na których to Doktorant wraz z zespołem przeprowadził eksperyment badawczy. W oparciu o literaturę przedmiotu przedstawił współczesne metody leczenia ALS wraz z rolą treningu fizycznego, po czym uzasadnił przewagę treningu pływackiego nad innymi jego formami. Szczegółowo wyjaśnił funkcję poszczególnych białek szlaku Akt w zapobieganiu dystrofii mięśni poprzecznie prążkowanych szkieletowych oraz zmiany metaboliczne towarzyszące ALS, zwłaszcza w zakresie akumulacji mleczanu w komórkach mięśniowych i jego roli w degradacji mięśni. Weryfikacja ilości dwunukleotydów nikotynamidoadeninowych stanowi cenną część badań, które pozwalają na lepsze zrozumienie przyczyn akumulacji mleczanu w komórkach mięśniowych.

Cel pracy został przez Doktoranta jasno sprecyzowany i dotyczył próby wyjaśnienia mechanizmów ochronnych treningu pływackiego u myszy z mutacją *SOD1G93A*. Doktorant sformułował 4 hipotezy, przy czym dwie z nich dotyczyły sygnalizacji szlaku Akt oraz dwie metabolizmu mleczanu. Pan mgr. założył, że ochronne działanie treningu pływackiego polega na ograniczeniu atrofii komórek mięśniowych poprzez wpływ na szlak Akt oraz metabolizm mleczanu.

Rozdział materiał i metody badawcze został przygotowany w sposób przejrzysty. Początkowo Pan mgr przedstawił aspekt etyczny badań, kolejno procedurę przydzielenia myszy do odpowiednich grup: ALS BEFORE, ALS ONEST oraz ALS TERMINAL. Podał także punkty czasowe uśmiercenia myszy z poszczególnych grup, powołując się na odpowiednią literaturę. W tym miejscu warto zwrócić uwagę na szeroki wachlarz procedur i technik, wykorzystywanych w eksperymencie: przeprowadzenie treningu pływackiego u myszy, pobór krwi, preparacja mięśnia piszczelowego przedniego, przygotowanie materiału biologicznego do Western Blot, cytometrii przepływowej, analizy proteomicznej, czy też technik oznaczania aktywności poszczególnych enzymów. Dobrane metody analizy statystycznej wyników nie budzą zastrzeżeń. Rozdział „Wyniki” został podzielony na dwa podrozdziały odpowiadające wynikom opisanym w artykule nr 1 oraz 2. O wartości naukowej rozprawy w dużym stopniu świadczy dojrzałość przeprowadzenia dyskusji uzyskanych wyników badań własnych. W tym względzie Doktorant zasługuje na szczególną pochwałę, gdyż dyskusja wymagała znajomości nie tylko szlaków sygnałowych, ale także wpływu różnych czynników (stresu oksydacyjnego czy fosfatazy i homologu tensyny (PTEN)) na stłumienie sygnalizacji IGF-1 w kierunku Act). Szczegółowo opisał i przedyskutował wyniki dotyczące części szlaku sygnałowego odpowiedzialnego za atrofię mięśni poprzecznie prążkowanych szkieletowych, czyli FOXO3a/atrogina-1/MuRF-1 i funkcję stresu oksydacyjnego w ich indukcji, a tym samym w nasileniu proteolizy białek mięśni. Ochronne działanie treningu pływackiego poprzez zmniejszenie ich ekspresji jest prawdopodobną przyczyną ochrony białek mięśni przed rozpadem. Jednak argument dotyczący zmniejszenia stresu oksydacyjnego u zwierząt trenowanych wymaga nieco dokładniejszego wyjaśnienia, gdyż wysiłek fizyczny jest znanym induktorem tworzenia się wolnych rodników i reaktywnych form tlenu, zaś efekt zwiększenia obrony antyoksydacyjnej jest efektem adaptacyjnym. Z kolei dyskutując zmiany mTOR dyplomant wykazał, że ochronne działanie treningu pływackiego opiera się na hamowaniu sygnalizacji FOXO3a/MuRF-1.

Wyniki oraz fragment dyskusji dotyczący upośledzenia metabolizmu mleczanu towarzyszącego ALS jest bardzo ciekawą częścią dysertacji doktorskiej. Obniżenie stężenia mleczanu w osoczu z równoczesnym zwiększeniem jego koncentracji w mięśniach poprzecznie prążkowanych szkieletowych i funkcja transporterów MCT1 i MCT4 została bardzo klarownie przedyskutowana. Co więcej, Doktorant podjął próbę wyjaśnienia zwiększenia stężenia mleczanu w mięśniach szkieletowych przy równoczesnym obniżeniu stężenia enzymów glikolizy, w tym dehydrogenazy mleczanowej. Oznaczenie $NAD^+/NADH + H^+$ i poszukiwanie

przyczyn zahamowania glikolizy w obniżeniu się stężenia jego formy utlenionej w stosunku do zredukowanej mogło wyjaśnić molekularny mechanizm obniżenia tempa glikolizy. Dodatkowo, możliwość interpretacji wyników została zwiększona poprzez oznaczenie LDH 0,3 (podjednostki enzymu H4). Obie hipotezy dotyczące rozbieżności pomiędzy zwiększonym stężeniem mleczanu przy równoczesnym obniżeniu aktywności dehydrogenazy mleczanowej są prawdopodobne: tj. założenie wycieku dehydrogenazy ze względu na uszkodzenia błony komórkowej mięśni, czy też zmiany aktywności enzymu przekształcającego mleczan w pirogronian.

Na podstawie uzyskanych wyników badań Pan mgr Karol Ciemiński wyciągnął 5 wniosków, korelujących z hipotezami badawczymi.

Za bardzo cenne wnioski wynikające z pracy należy uznać m.in.: zaburzenie sygnalizacji szlaku Akt w części odpowiadającej za atrofię komórek mięśniowych (FOXO3a, MuRF-1) oraz represyjne działanie treningu pływackiego na te białka, co w konsekwencji prowadzi do mniejszej utraty masy mięśni u myszy z ALS; zaburzenie w metabolizmie mleczanu bez zmian stężeń transporterów MCT1 i MCT4; zmniejszenie stężeń $\text{NAD}^+/\text{NADH} + \text{H}^+$ i dehydrogenazy mleczanowej bez zmian w aktywności MDH, czy też wpływ treningu pływackiego na [LA] bez zmian w stężeniach badanych dinukleotydów i transporterów mleczanu. W związku z powyższym wysoko oceniam merytoryczną stronę pracy doktorskiej.

4. Poprawność redakcyjna rozprawy

Rozprawa doktorska mgr. Karola Ciemińskiego napisana jest dobrym językiem naukowym, z dużą starannością o stronę edytorską, w tym jasność wypowiedzianych treści i ich przejrzystość. Warto podkreślić, że prace z zakresu biochemii charakteryzują się stosunkowo trudnym językiem naukowym, m.in. ze względu na nazewnictwo związków chemicznych, enzymów, białek itp. Po przeczytaniu opracowania 2 artykułów wydanych w j. angielskim mogę stwierdzić, że Doktorant poradził sobie z tym wyzwaniem bez zastrzeżeń.

5. Uwagi krytyczne

Uwagi krytyczne odnoszą jedynie do części dysertacji przygotowanej w j. polskim. W mojej ocenie w wielu miejscach pracy Doktorant mógł wyrażać się bardziej precyzyjnie. Przykładowo Pan mgr używa słowa „trening”, gdzie bardziej precyzyjnie byłoby użyć terminu „trening

fizyczny”, mięśnie, bez wskazania jakie (oczywiście można się domyśleć, że chodzi o poprzecznie prążkowane szkieletowe). Często używa słowa „modyfikacja”. W mojej ocenie precyzyjniejsze byłoby stwierdzenie kierunku zmiany, czyli w opisie użycie słowa „zwiększenie” czy też „zmniejszenie”. W rozdziale „Materiały i metody badawcze” odwołuje się wielokrotnie do wskazania artykułu opisującego np. metodykę przeprowadzenia treningu pływackiego u myszy czy też punktów czasowych rozpoczęcia treningu i jego zakończenia. W oryginalnych artykułach naukowych takie postępowanie jest wręcz wskazane, jednak zadaniem Doktoranta jest szczegółowy opis metod badawczych stosowanych w przygotowaniu publikacji, zwłaszcza w przypadku, gdy rzadko na AWF-ach bronię prace, w których badania wykonywane są na modelu zwierzęcym. Podczas obrony pracy poproszę Doktoranta o wyjaśnienie wpływu wysiłku fizycznego (jednorazowego i powtarzalnego) na status prooksydacyjny i antyoksydacyjny w organizmie człowieka. Jednak powyższe uwagi nie wpływają na wysoko ocenioną przeze mnie wartość merytoryczną cyklu artykułów.

6. Ocena końcowa

Podsumowując, przedstawiony do recenzji ciąg publikacyjny stanowiący podstawę ubiegania się o stopień doktora nauk o kulturze fizycznej oceniam bardzo wysoko. Podjęty w niej temat jest istotny z uwagi na ciągłe poszukiwanie sposobów przedłużenia życia i poprawę jego jakości chorych cierpiących na ALS. Prace mgr. Karola Ciemińskiego w pełni wpisują się w dziedzinę nauk medycznych i nauk o zdrowiu, dyscyplinę nauk o kulturze fizycznej. Po zapoznaniu się z przygotowaną przez Doktoranta dysertację doktorską stwierdzam, że Kandydat spełnia wszystkie warunki określone w art. 180 ust. 1 i 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2022 poz. 574). Dlatego wnioskuję do Wysockiej Rady Naukowej Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu o dopuszczenie Kandydata do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. Małgorzata Zychowska, profesor UKW

