

dr hab. Andrzej Borman, prof. em. UG  
Katedra Fizjologii Zwierząt i Człowieka  
Wydział Biologii Uniwersytetu Gdańskiego

## **OCENA**

### **rozprawy doktorskiej mgr Mateusza Karni pt. " Wpływ endogennych glikokortykoidów na metabolizm tlenowy i atrofię mięśnia szkieletowego"**

Glikokortykoidy (GK) – u człowieka przede wszystkim kortyzol, a u szczurów kortykosteron – to najważniejsze, „końcowe” hormony reakcji stresowej, która stanowi jak wiadomo podstawowy, ogólnoustrojowy mechanizm adaptacyjny umożliwiający normalne funkcjonowanie w ciągle zmieniającym się środowisku, w tym wysiłek fizyczny. Wbrew opiniom niektórych psychologów wysiłek fizyczny (nawet pozytywnie umotywowany) prowadzi wprost do uruchomienia osi podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowej (PPN) i wywołuje typową reakcję stresową, bez której nie byłby w ogóle możliwy. Problem z odpowiedzią stresową polega m.in. na tym, że (szczególnie, gdy ma charakter długotrwały) niesie ona za sobą określone koszty – energetyczne, fizjologiczne, a także w końcu patologiczne w postaci uszkodzeń strukturalnych. Te ostatnie w warunkach zwiększonego w stresie popytu na energię są skutkiem głównie glikoneogenezy, która nieuchronnie prowadzi w pierwszej kolejności do inwolucji tkanki grasiczo-limfatycznej, a następnie tkanki łącznej, w tym mięśni. Jak zwraca uwagę Doktorant, następstwa stresu prowadzą do jednych z najbardziej alarmujących problemów zdrowotnych współczesnych społeczeństw, a mimo to, mechanizmy molekularne, odpowiedzialne za jego negatywne skutki wciąż pozostają niedostatecznie wyjaśnione. W sporcie wyczynowym, dążąc do maksymalizacji wydolności organizmu poprzez m.in. optymalizację obciążeń treningowych, rzesze specjalistów (trenerów, psychologów, fizjologów, fizjoterapeutów) nieustannie poszukują kompromisu, swoistego balansu, „złotego środka” pomiędzy pozytywnymi (mobilizacja, uruchamianie rezerw), a negatywnymi (zużycie, wyczerpanie rezerw) skutkami stresu, zarówno w sferze mentalnej zawodników, jak i ich fizjologii.

Tematyka związana z badaniami Doktoranta w ramach jego rozprawy doktorskiej łączy się z faktem, że – jak sam pisze – „mimo dużej dostępności danych dotyczących katabolicznej roli długotrwałej ekspozycji na działanie syntetycznych GK, wciąż niedostatecznie wyjaśniony pozostaje wpływ endogennych GK na metabolizm tlenowy, indukcję stresu oksydacyjnego i atrofię mięśni szkieletowych w trakcie chronicznej reakcji stresowej”. Dalej Autor zwraca uwagę, że „istotne podkreślenia są również wyniki badań wskazujące potencjalnie dwukierunkowe (anaboliczne/kataboliczne) działanie GK, w zależności od czasu ekspozycji oraz ich stężenia”. Rzeczywiście, wiele różnych aspektów działania GK *in vivo* (w przeciwieństwie do *in vitro*) pozostaje nieznanymi, a inne trudno jednoznacznie wyjaśnić i przewidzieć. Ta dwukierunkowość efektów (być może związana m.in. z wrażliwością krzyżową receptorów gliko- i mineralokortykoidowych) ujawnia się znacząco także w obrębie układu immunologicznego, zarówno w procesach zapalnych, jak i modulacji odczynów immunologicznych. Biegunowo zróżnicowane działanie GK może się ponadto przejawiać w ich wpływie na inne układy: system krążenia krwi, przewód pokarmowy, wątrobę, a przede wszystkim procesy ośrodkowe – szczególnie dużą koncentrację GR obserwuje się np. w strukturach systemu limbicznego. Warto tutaj zauważyć również, że GK, niezależnie od swego zasadniczo katabolicznego *in vitro* działania, mogą przy udziale białek opiekuńczych wpływać w określonych warunkach na przetrwanie/rewitalizację komórek. Biorąc to wszystko pod uwagę, znaczenie badań podjętych przez Doktoranta – moim zdaniem – wykracza wyraźnie poza wąskie zagadnienia związane z obciążeniami w sporcie, ale łączy się z podstawowymi problemami fizjologii stresu i jest zatem niewątpliwie trudne do przecenienia.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr Mateusza Karni ma formę „składanki” trzech publikacji opatrzonej dwujęzycznym omówieniem. Muszę w tym miejscu podkreślić, że rola recenzenta w takim przypadku jest zasadniczo odmienna w porównaniu z recenzowaniem „klasycznego”, nie opublikowanego manuskryptu – staje się istotnie ograniczona faktem, że każda ze składowych publikacji przeszła już pełny, nierzadko mocno rygorystyczny proces wydawniczo-recenzencki w renomowanych czasopismach, w których się one ukazały. W tej sytuacji – w ramach obowiązków recenzenta – pozostaje mi więc tylko potwierdzić, że publikacje wchodzące w skład rozprawy zamieszczono w latach 2018, 2020 i 2021 w wysoko klasyfikowanych czasopismach z tzw. listy filadelfijskiej (odpowiednio w *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *International Journal of Molecular Science* i *Nutrients*), ich łączna „wartość”



wyznaczona przez MEiN wynosi 380 punktów, a łączny Impact Factor – 14,178. We wszystkich tych publikacjach Doktorant jest ich pierwszym autorem. Z formalnego punktu widzenia warto dodać także, że ostatnim współautorem prac jest Promotor Doktoranta, prof. Jan Jacek Kaczor, nie ma zatem wątpliwości, że całość rozprawy powstała pod Jego kierunkiem. Potwierdzam także, że przedstawione mi jako rozprawa doktorska trzy wieloautorskie publikacje stanowią bez wątpienia oryginalny i spójny tematycznie, a także metodologicznie, cykl badań naukowych.

Wszystkie badania Autor przeprowadził na jednolitym materiale doświadczalnym – w prawidłowo dobranych grupach 8-10 tygodniowych samców szczurów szczepu Wistar. W dwóch pierwszych pracach zwierzęta stresowano neurogennie stosując wielokrotną (w ciągu 2 lub 4 tygodni) stymulację jądra łożyskowego prążka krańcowego (BST, dawniej BNST) poprzez chirurgicznie zaimplantowane chroniczne elektrody. W trzeciej pracy model stresu stanowił bądź to kombinację stresora fizycznego (zimno) oraz psychicznego, przypominającego sytuację prowadzącą do tzw. wyuczonej bezradności (izolacja oraz niemożność wydostania się z zimnej wody), bądź opierał się o dootrzewnowe iniekcje syntetycznego GK w postaci deksametazonu.

Nie wnikając w szczegóły, z polskojęzycznego omówienia wyników uzyskanych w ramach przeprowadzonych doświadczeń dowiadujemy się m.in., że czterotygodniowa stymulacja jądra BST (ST4) skutkowała istotnie statystycznie większym wyrzutem kortykosteronu do krwiobiegu w stosunku do zwierząt z grupy kontrolnej, zaś u szczurów stymulowanych 2 tygodnie (ST2) efektu tego nie obserwowano. Ponadto wykazano różnice w zakresie wolnorodnikowych uszkodzeń białek (mierzonych poziomem grup sulfhydrylowych – SH) w mięśniach białych (EDL) i czerwonych (SOL) – do uszkodzeń dochodziło wyłącznie w mięśniach EDL i to zarówno wśród zwierząt poddawanych stymulacji przez 2, jak i 4 tygodnie. Różnice między mięśniami EDL i SOL dotyczyły także aktywności całkowitej dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), która wzrastała wyłącznie w mięśniach EDL u zwierząt z obu grup – ST2 i ST4. Natomiast aktywność mitochondrialnej dysmutazy ponadtlenkowej (MnSOD), katalazy (CAT) oraz peroksydazy glutationowej (GPx) wzrastała tylko w grupie ST4, zarówno w mięśniach białych, jak i czerwonych. Wykazano również, że do istotnego podwyższenia poziomu markera atrofii mięśni – atroginy-1 (FBXO32) dochodzi zarówno w mięśniach SOL, jak i EDL u zwierząt z grupy ST4. Jednak w mięśniach SOL wśród szczurów stymulowanych przez 4 tygodnie obserwowano istotny statystycznie wzrost poziomu IGF-1 stanowiącego prekursor syntezy białek oraz wyższą aktywność syntazy cytrynianowej (CS). Wyniki



wskazują także, że w warunkach chronicznej reakcji stresowej dochodzi u szczurów do wysoce istotnego statystycznie wzrostu poziomu receptorów mineralokortykoidowych w mięśniach białych, a glikokortykoidowych w mięśniach SOL. U zwierząt stresowanych w zimnej wodzie stwierdzono wysoce istotny statystycznie wzrost stężenia kortykosteronu we krwi, jednak nie zanotowano u nich zmian w zakresie masy ciała, w tym masy poszczególnych typów mięśni szkieletowych.

Całość omówienia rozprawy wieńczą trzy krótkie wnioski. Podczas pierwszego, pobieżnego jeszcze przeglądania polskojęzycznego omówienia ucieszyłem się, że oto znalazł się doktorant, który jako jeden z nielicznych potrafi przeprowadzić syntezę, eliminację, oddzielić rzeczy ważne od najważniejszych, a jego wnioski nie są po prostu podsumowaniem, rekapitulacją najważniejszych otrzymanych wyników, lecz są wnioskami *sensu stricto*. Jednak przeczytawszy je rozczarowałem się. Autor niestety przesadził z syntezą. Jego wnioski są tak dalece skrócone, odarte z wszelkich szczegółów (nieśmiało?), że niepostrzeżenie zaczęły ocierać się o oczywistość, czyli o banał i w żaden sposób nie są w stanie (a powinny!) pokazać wymierne znaczenie i rangę przeprowadzonych przez Niego badań. Z całą mocą chcę przy tym podkreślić, że wydaje się być to problemem wyłącznie warsztatu redakcyjnego Autora, gdyż – jak się okazało – ważne i inspirujące wnioski zawarte są w anglojęzycznych pracach stanowiących podstawę rozprawy, tylko nie wiedzieć czemu nie zostały one należycie wyeksponowane w polskojęzycznym opracowaniu.

Co prawda to opracowanie pełni zwyczajowo drugorzędną rolę w rozprawie, ponieważ podstawą jej oceny merytorycznej są opublikowane prace, tym niemniej apeluję do Doktoranta, by śmiało pokonał nieuzasadnioną skromność(?) i podczas obrony pochwalił się swoimi niekwestionowanymi osiągnięciami wymienionymi w konkluzjach publikacji. I tak na przykład naprawdę warto wyeksponować, że (proponuję do wyboru): \*Uzyskane dane mogą wskazywać, że stymulacja elektryczna jądra BST może być przydatna jako nowatorskie narzędzie eksperymentalne do generowania modelowej reakcji stresowej; \*Przedstawione badania pokazują po raz pierwszy, że kortykosteron (i w ogóle reakcja stresowa) wywierają u szczurów poważny, dwufazowy wpływ na zanik i przebieg dewastacji mięśni czerwonych; \*Proponujemy potencjalne mechanizmy, w jaki sposób GK (i w ogóle reakcja stresowa) regulują krytyczne szlaki metaboliczne związane z atrofią i zachowaniem funkcji mięśni SOL, jako wymagające energii z mitochondriów mogącej pokryć wzmożony w tych warunkach obrót ATP; \*Możliwość, że szlak GK/IGF-1, który wzmacnia funkcję mitochondriów, może być przydatny w przeciwdziałaniu



szkodliwym skutkom nadmiernego wysiewu GK obserwowanego w stresie, stanowi ekscytującą perspektywę dla przyszłych badań; \*Co więcej, rodzi to również intrygujący problem związany z regulacją i hamowaniem działania receptorów gliko- i mineralokortykoidowych lub/i aktywności dehydrogenazy HSD11B1, jako terapii wspomagającej w celu ograniczenia niekorzystnych skutków związanych z nadmiarem GK; a także, w nawiązaniu do witaminy D3 zastosowanej w badaniach opisanych w trzeciej pracy – np.: \*Suplementacja witaminą D3 wydaje się zapobiegać atrofii mięśni indukowanej dootrzewnowymi iniekcjami syntetycznego GK w postaci deksametazonu. Uważam, że dość niezręczne jest zupełne pominięcie we wnioskach zawartych w omówieniu (i jego streszczeniu) na tyle istotnych elementów wyników badań, że zostały one uwypuklone przez Autora w tytułach publikacji – „...the biphasic action of endogenous glucocorticoids.”, czy „The Positive Impact of Vitamin D...”.

Pragnę ponownie podkreślić, że nie mam żadnych istotnych zastrzeżeń dotyczących merytorycznej strony wszystkich trzech publikacji. Poza powyższymi wątpliwościami dotyczącymi wniosków zamieszczonych w polskojęzycznym omówieniu rozprawy, pozostałe moje zastrzeżenia mogłyby być związane jedynie z drobnymi usterkami redakcyjnymi, językowymi i tzw. literówkami, jednak jest ich stosunkowo niewiele, są typowe i zazwyczaj nie sposób się ich ustrzec.

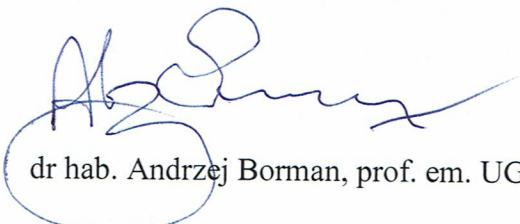
Pozostaje kwestia, na którą chciałbym tutaj zwrócić uwagę, gdyż wydaje mi się ważna. Otóż dotyczy ona pojęcia stresu chronicznego, które – moim zdaniem – jest w literaturze przedmiotu nadużywane i przewija się także przez całą rozprawę. W pracach eksperymentalnych (i w życiu) obciążenia stresowe możemy ze względu na czas trwania podzielić na krótkotrwałe (ostre, trwające zwykle kilka godzin) oraz długotrwałe. Te ostatnie mogą mieć charakter ciągły (chroniczny) lub wielokrotny (multiple), w którym obciążenie powtarzane jest w regularnych, bądź nieregularnych odstępach czasu. Oczywiście może się zdarzyć, że wielokrotne powtarzanie stresowania doprowadzi do chronicznej reakcji stresowej, ale jej diagnostyka w ogóle jest bardzo trudna i nawet jeśli nie wymaga ciągłego monitorowania zawartości głównych hormonów stresowych we krwi obwodowej, to zwykle i tak pozostawia wiele do życzenia. To rozróżnianie stresu chronicznego i wielokrotnego wydaje mi się o tyle zasadne, że jak wykazały m.in. wieloletnie badania w mojej macierzystej Katedrze na UG, efekty obciążeń ciągłych w porównaniu do wielokrotnych mogą być istotnie różne (przynajmniej w obrębie układu immunologicznego). A już dosłownie „grzechem pierworodnym” jest powszechne w piśmiennictwie utożsamianie przyczyny ze skutkiem – stresowania ze stresem, czyli

reakcją stresową, która przecież może wystąpić, ale nie musi, albo w trakcie długotrwałych obciążeń ulega różnym wtórnym zmianom adaptacyjnym.

W podsumowaniu stwierdzam, że praca doktorska mgr Mateusza Karni oparta jest na dopracowanej koncepcji tematycznej oraz kompleksowych badaniach zaplanowanych logicznie i zgodnie z wymogami nowoczesnej, wyrafinowanej metodologii badawczej. Szeroki materiał wynikowy został opracowany w sposób właściwy, co pozwoliło Doktorantowi na wysunięcie ciekawych wniosków, które zawarł w przedstawionych publikacjach. Całość rozprawy napisana jest prawidłowym językiem, w sposób zrozumiały i interesujący dla czytelnika. Autor wykazał się umiejętnością planowania i prowadzenia badań naukowych, stawiania i dojrzałego rozwiązywania problemów badawczych, znajomością bieżącego i klasycznego piśmiennictwa oraz biegłością w jego wykorzystywaniu, a także w precyzyjnym formułowaniu myśli.

Całość rozprawy oceniam wysoko. Uważam, że wnosi ona oparte na wynikach własnych istotne, nowatorskie dane do ewentualnego wykorzystania w nauce (i być może w praktyce) stanowiąc twórcze uzupełnienie aktualnego i zawierającego ciągle szereg luk obszaru badań z zakresu fizjologii stresu, wysiłku fizycznego i mięśni szkieletowych.

Uważam, że przedstawiony mi do recenzji materiał spełnia wszystkie ustawowe warunki stawiane rozprawom doktorskim. Z powyższych względów stawiam wniosek o dopuszczenie mgr Mateusza Karnię przez Radę Naukową Akademii Wychowania Fizycznego i Sportu im. Jędrzeja Śniadeckiego w Gdańsku do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



dr hab. Andrzej Borman, prof. em. UG

Gdańsk, 14. kwietnia 2021 r.