

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Agaty Grzybkowskiej
pt. „*Molekularne mechanizmy adaptacji do wysiłku fizycznego - zmiany*
***ekspresji wybranych genów w leukocytach*”**
napisanej pod kierunkiem prof. dr hab. Jędrzeja Antosiewicza

Uwagi ogólne

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi ważne i interesujące dzieło naukowe dotyczące molekularnych mechanizmów adaptacji do wysiłku fizycznego. Autorka podjęła się badań trudnych pod względem merytorycznym i metodycznym, mających na celu określenie zmian w ekspresji wybranych genów związanych z metabolizmem żelaza, indukowanych wysiłkiem fizycznym połączonym z suplementacją witaminą C lub kwasami omega-3. Podjęcie próby określenia optymalnych punktów czasowych zmiany w ekspresji genów dla biegu maratońskiego, jak również zidentyfikowanie optymalnych genów referencyjnych do analizy zmian ekspresji genów dla treningu wytrzymałościowego ma istotną wartość poznawczą.

Formalne i prawne podstawy wykonania recenzji

Recenzja została sporządzona w oparciu o uchwałę nr 5 Rady Naukowej Akademii Wychowania Fizycznego i Sportu im. Jędrzeja Śniadeckiego w Gdańsku z dnia 19 września 2023 roku (zgodnie z ustawą z dnia 20 lipca 2018 roku *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce*, Dz.U. z 2023 r. poz. 742 ze zm.).

Struktura pracy i ocena treści

Praca doktorska, którą otrzymałam do recenzji obejmuje wykaz prac wchodzących w skład rozprawy, wprowadzenie, cele naukowe, omówienie prac oryginalnych wchodzących w skład rozprawy, wnioski, streszczenie w języku angielskim, piśmiennictwo oraz załączniki tj. oświadczenia współautorów, publikacje wchodzące w skład pracy doktorskiej, publikacje nie włączone do rozprawy

doktorskiej, wyróżnienia i osiągnięcia. Opracowanie łącznie liczy 65 stron maszynopisu.

Rozprawę doktorską stanowi cykl trzech oryginalnych prac naukowych opatrzonych wspólnym tytułem „*Molekularne mechanizmy adaptacji do wysiłku fizycznego - zmiany ekspresji wybranych genów w leukocytach*” o łącznym IF=15,891 i punktacji MEiN=380:

1. **Grzybkowska, A.**, Anczykowska, K., Ratkowski, W., Aschenbrenner, P., Antosiewicz, J., Bonisławska, I., Żychowska, M. Changes in serum iron and leukocyte mRNA levels of genes involved in iron metabolism in amateur marathon runners-effect of the running pace. *Genes* 2019, 10(6), 460. IF=3,759; MEiN=100,
2. Żychowska, M., **Grzybkowska, A.**, Wiech, M., Urbański, R., Pilch, W., Piotrowska, A., Czerwińska-Ledwig, O., Antosiewicz, J. Exercise training and Vitamin C supplementation affects ferritin mRNA in leukocytes without affecting prooxidative/antioxidative balance in elderly women. *International Journal of Molecular Sciences* 2020, 21(18), 6469. IF=5,924; MEiN=140,
3. **Grzybkowska, A.**, Anczykowska, K., Antosiewicz, J., Olszewski, S., Dzitkowska-Zabielska, M., Tomczyk, M. Identification of Optimal Reference Genes for qRT-PCR Normalization for Physical Activity Intervention and Omega-3 Fatty Acids Supplementation in Humans. *International Journal of Molecular Sciences* 2023, 24(7), IF=6,208; MEiN=140.

W dwóch pracach Doktorantka jest pierwszym autorem, a w jednej drugim. Zgodnie z deklaracją Autorki i oświadczeniami złożonymi przez współautorów, udział jej w pracach obejmował m. in. przygotowanie projektu badań, przeprowadzenie badań, analizę statystyczną, interpretację wyników, opracowanie piśmiennictwa i przygotowanie publikacji. Badania przedstawione w pracach były finansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego – grant „*Rozwój sportu akademickiego*” nr N RSA4 06754 (publikacje 1 i 2) oraz przez Narodowe Centrum Nauki - grant Preludium 16 nr 2018/31/N/NZ7/02962 (publikacja 3).

W zwięzłym „*Wprowadzeniu*” Autorka uzasadniła tematykę podjętej pracy oraz omówiła korzyści płynące z wykorzystania zaawansowanych technik biologii molekularnej w badaniach związanych z wysiłkiem fizycznym. Precyzyjnie wyjaśniła,

czym jest metoda ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (qRT-PCR), którą wykorzystała do oceny zmian ekspresji genów w leukocytach. W kolejnym akapicie ww. rozdziału przedstawiała obszary swoich zainteresowań naukowych będących tematem badań prezentowanych w rozprawie doktorskiej. Następnie odniosła się do metabolizmu żelaza i jego znaczenia w wysiłku fizycznym oraz wyjaśniła mechanizmy regulujące jego poziom w organizmie ludzkim. W akapicie kończącym „Wprowadzenie” Autorka podkreśliła nowatorski charakter prezentowanych w rozprawie badań.

Zasadniczo „Wprowadzenie” stopniowo wprowadza w meritum podjętego problemu badawczego. Szkoda tylko, że Autorka nie poruszyła wątku, który jest związany z omawianymi przez nią pracami i dotyczy wpływu suplementacji witaminą C i kwasami omega-3 na ekspresję badanych przez nią genów.

Z zauważonych błędów w tej części pracy zwrócę uwagę na niepoprawne stwierdzenie (str. 6), że *„Żelazo jest niezwykle ważnym pierwiastkiem związanym z wysiłkiem fizycznym ze względu na jego bezpośrednią rolę w [...] w transporcie tlenu przez hemoglobinę i mioglobinę”*. O ile prawdą jest, że hemoglobina odgrywa istotną rolę w transporcie tlenu, to mioglobina pełni nieco inną funkcję. Proszę o wyjaśnienie różnicy w budowie i funkcjach tych dwóch białek.

Ponadto, w kończącym akapicie tego rozdziału Autorka zamieściła niekompletną informację nt. nazwy komisji bioetycznej, która wyraziła zgodę na przeprowadzenie badań będących przedmiotem rozprawy doktorskiej.

W kolejnym rozdziale Autorka jasno sformułowała 5 głównych celów badawczych, a następnie syntetycznie omówiła prace oryginalne wchodzące w skład pracy. Myślę, że z korzyścią dla prezentowanej formy rozprawy doktorskiej byłoby umieszczenie po celach rozdziału poświęconego metodologii badań, w którym zostałyby m.in. uwzględnione grupy badawcze, opis form aktywności fizycznej zastosowanych w badaniach oraz dokładne opisanie metody Real-Time PCR, która jest niewątpliwie nowatorską techniką badawczą.

W pierwszej pracy pt. *„Changes in serum iron and leukocyte mRNA levels of genes involved in iron metabolism in amateur marathon runners-effect of the running pace”* Autorka wraz ze współautorami przedstawiła wyniki badań dotyczące zmian stężenia żelaza i ferrytyny w surowicy wraz ze zmianami poziomu mRNA genów kodujących białka zaangażowane w metabolizm żelaza tj. PCBP1 (białko wiążące poli (rC) 1), PCBP2 (białko wiążące poli (rC) 2), FTH1 (ferrytyna łańcuch ciężki 1), FTL

(łańcuch lekki ferrytyny) i TFRC (receptor transferyny). Celem badania było również określenie związku między zmianami w ekspresji genów w leukocytach a wyjściowymi stężeniami żelaza i ferrytyny w surowicy, oraz tempem biegu podczas maratonu. Autorzy założyli, że bieg maratoński wpłynie na wzrost poziomu mRNA genów związanych z metabolizmem żelaza, i że zmiany te będą zależne od tempa biegu.

W badaniu udział wzięło 28 zdrowych mężczyzn, którym pobierano krew w 4 punktach czasowych tj. przed rozpoczęciem biegu, tuż po jego ukończeniu oraz 3 i 24 godziny po jego zakończeniu. Część pobranego materiału biologicznego wykorzystano do oceny ekspresji genów, a w pozostałym oznaczano morfologię krwi, stężenie żelaza, ferrytyny, kwasu moczowego, kinazy kreatynowej i białka C-reaktywnego.

Uzyskane wyniki badań potwierdziły hipotezę, że bieg maratoński wpływa na zmiany zarówno wskaźników surowicy krwi, jak również na ekspresję genów związanych z metabolizmem żelaza, oraz że zaobserwowane zmiany występują w różnych odstępach czasowych.

W kolejnej pracy pt. *„Exercise training and Vitamin C supplementation affects ferritin mRNA in leukocytes without affecting prooxidative/antioxidative balance in elderly women”* Autorka wraz z współautorami oceniała wpływ 6-tygodniowego zdrowotnego programu treningowego połączonego z suplementacją witaminą C w dawce 1g/dobę na całkowity stres oksydacyjny i potencjał antyoksydacyjny oraz na geny związane z komórkową odpowiedzią na stres oraz z metabolizmem żelaza. Autorzy założyli, że poprawa potencjału antyoksydacyjnego spowodowana treningiem i zastosowaną suplementacją wpłynie na obniżenie stężenia mRNA genów związanych z metabolizmem żelaza. Badaniami objęto 15 zdrowych kobiet w wieku starszym, które realizowały 12-tygodniowy program treningowy składający się z różnych form aktywności fizycznej (m.in. gimnastyki czy nordic walking). Podobnie jak w poprzedniej publikacji oceniano następujące geny: FTH1, FTL, PCBP1, PCBP2 oraz gen kodujący katalazę (CAT).

Na podstawie uzyskanych wyników badań stwierdzono, że trening połączony z suplementacją witaminą C nie wpłynął na równowagę prooksydacyjno/antyoksydacyjną. Obserwowano jedynie znaczne obniżenie poziomu mRNA genów FTH i FTL u badanych kobiet.

W ostatniej pracy pt. *„Identification of Optimal Reference Genes for qRT-PCR Normalization for Physical Activity Intervention and Omega-3 Fatty Acids Supplementation in Humans”* Autorka wraz z współautorami dokonała identyfikacji stabilnych genów, które mogą być określone mianem genów referencyjnych. Ekspresję tych genów analizowano u biegaczy długodystansowych przed i po 12 tygodniach treningu wytrzymałościowego połączonego z suplementacją kwasami omega-3. Wynikami badań Autorka wykazała, że geny GAPDH (dehydrogenaza aldehydu gliceryno-3-fosforanowego), TUBB (tubulina beta) i HPRT (fosforybozylotransferaza hipoksantynowa) mogą być odpowiednimi genami referencyjnymi wykorzystanymi w badaniach obejmujących aktywność fizyczną i suplementację kwasami omega-3.

Rozdział pt. *„Omówienie prac oryginalnych wchodzących w skład rozprawy”* kończy 7 wniosków, które wypływają z badań ujętych w pracach i odpowiadają uzyskanym wynikom.

Uwagi końcowe

Badania przedstawione w recenzowanej rozprawie są oryginalnym osiągnięciem Autorki, a prace stanowiące cykl publikacji pt. *„Molekularne mechanizmy adaptacji do wysiłku fizycznego - zmiany ekspresji wybranych genów w leukocytach”* to zbiór logicznie i wzajemnie się dopełniających danych o dużej wartości naukowej. Na uwagę zasługuje fakt, że wszystkie prace wcześniej były pozytywnie ocenione przez niezależnych recenzentów i finalnie zostały opublikowane w prestiżowych czasopismach naukowych o wysokich współczynnikach wpływu.

Z uwagi na powyższe, zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Akademii Wychowania Fizycznego i Sportu im. Jędrzeja Śniadeckiego w Gdańsku o dopuszczenie Pani mgr Agaty Grzybkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ewa Sadowska-Kispe