

Prof. AWF dr hab. Joanna Karolkiewicz

Poznań, 04.10.2023r.

Wydział Nauk o Zdrowiu

AWF im. Eugeniusza Piaseckiego w Poznaniu

Zakład Żywności i Żywienia

Tel:618355287

karolkiewicz@awf.poznan.pl

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Agaty Grzybkowskiej, zatytułowanej

**“ Molekularne mechanizmy adaptacji do wysiłku fizycznego -
zmiany ekspresji wybranych genów w leukocytach”**

przygotowanej pod kierunkiem promotora – prof. dr. hab. Jędrzeja Antosiewicza

Recenzja sporządzona została na podstawie przedłożonej przez Panią mgr rozprawy doktorskiej składającej się z cyklu trzech publikacji pod wspólnym tytułem “Molekularne mechanizmy adaptacji do wysiłku fizycznego – zmiany ekspresji wybranych genów w leukocytach”, o łącznej punktacji : Impact Factor - 15,891; punktacja MEiN – 380 pkt. Do pracy załączone zostały stosowne oświadczenia Współautorów, z których wynika że Doktorantka była pierwszym Autorem w dwóch artykułach i drugim Autorem w jednym z cyklu artykułów, co dowodzi, że odgrywała dominującą rolę w prowadzonych badaniach i przygotowaniu artykułów. Ponadto Doktorantka pozyskała finansowanie na przeprowadzone badania poprzez pozyskanie Grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego N RSA4 06754: „Rozwój sportu akademickiego” (publikacje 1 i 2) oraz Grantu Preludium 16 Narodowego Centrum Nauki o numerze 2018/31/N/NZ7/02962 (publikacja 3).

Ocena wyboru tematu rozprawy doktorskiej

W przeglądzie immunologii wysiłkowej opublikowanym w 2020 roku w czasopiśmie *Journal of Sport and Health Science* (JSHS) dokonano podsumowania zebranych do tej pory najistotniejszych informacji dotyczących wpływu wysiłku fizycznego na układ immunologiczny człowieka. Dokonane obserwacje, dotyczyły, między innymi, postępu technologicznego, który w najbliższym czasie będzie promował i decydował o pozyskaniu wiedzy w zakresie immunologii wysiłkowej poprzez zdobycze biologii molekularnej, tj. metabolomikę, proteomikę, lipidomikę, mikrobiom jelitowy i genomiczne podejście. Takie „wieloomowe” zintegrowane podejście, może w przyszłości dostarczyć wielu cennych informacji dotyczących odpowiedzi na zadany wysiłek fizyczny ze strony immunologicznej i metabolicznej organizmu człowieka. Najnowsze badania ujawniły, że metabolizm i odporność są funkcjonalnie ze sobą silnie powiązane, co pozwala poszerzyć wiedzę w stosunkowo nowym obszarze wiedzy, jakim jest „immunometabolizm”. Wymagające obciążenia wysiłkowe stosowane przez sportowców wywołują głębokie zaburzenia w poziomie metabolitów oraz mediatorów lipidowych i białkach, które wpływają na aktywację komórek odpornościowych specyficzne zmiany metabolizmu komórkowego i ich funkcjonowania. Jednocześnie doniesienia naukowe z ostatnich lat, potwierdzają, że wysiłek fizyczny jest „głęboko zakorzeniony” w genach człowieka, wpływając na szereg epigenetycznych zmian ekspresji genów. Zatem, z całą pewnością poruszana tematyka badań Doktorantki jest trafna, nowatorska i wpisuje się w obecny nurt badań, a uzyskane wyniki badań są wartościowe z naukowego i praktycznego punktu widzenia.

Ocena realizacji celów badań i oryginalnego wkładu Autorki

Lektura cyklu trzech publikacji pod wspólnym tytułem “Molekularne mechanizmy adaptacji do wysiłku fizycznego – zmiany ekspresji wybranych genów w leukocytach”, dowodzi, że w toku badań Autorka postawiła sobie cele podstawowe oraz cele szczegółowe odnoszące się do poszczególnych publikacji.

Głównym celem badań wyznaczonym przez Autorkę w publikacji pt. *Changes in serum iron and leukocyte mRNA levels of genes involved in iron metabolism in amateur marathon runners-effect of the running* było określenie zmiany ekspresji wybranych genów w leukocytach związanych z metabolizmem żelaza (FTH, FTL, PCBP1, PCBP2, TFRC), które mogą stanowić jeden z wielu molekularnych mechanizmów adaptacji do wysiłku fizycznego. Należy stwierdzić, że Doktorantka osiągnęła wyznaczony cel i potwierdziła postawioną w

pracy hipotezę, że zmiany w ekspresji genów w leukocytach stanowią natychmiastową odpowiedź na wysiłek fizyczny, która następnie stymuluje późniejsze zmiany adaptacyjne. Przeprowadzenie tego typu eksperymentów, jak wskazała Doktorantka, stanowią novum w literaturze przedmiotu i myślę, że w krótkim czasie publikacja uzyska liczne cytowania. Drugim, w moim przekonaniu, bardzo istotnym celem nakreślony przez Autorkę była próba określenia optymalnych punktów czasowych zmian w ekspresji badanych genów dla biegu maratońskiego. Autorka podjęła się próby uchwycenia punktów czasowych od aktywności fizycznej do momentu uzyskania zmian w ekspresji genów w leukocytach, co z praktycznego punktu widzenia, stanowi olbrzymią wartość aplikacyjną, gdyż uzyskane dane pozwolą ustalić dość precyzyjne kryteria poboru krwi u sportowców w celu uchwycenia zmian powysiłkowych na poziomie molekularnym, które rzutują na potreningowe zmiany adaptacyjne. Dodatkowym celem w omawianych badaniach, jak wskazuje Doktorantka w wyszczególnionych celach naukowych w przygotowanym przez siebie komentarzu, była analiza związku pomiędzy uzyskaną liczbą transkryptów FTH i FTL, a poziomami białka ferrytyny we krwi. Również i ten cel został w pełni zrealizowany przez Doktorantkę, która na podstawie uzyskanych wyników badań wskazuje, że zmiany w mRNA genów zaangażowanych w metabolizm żelaza zachodzą niezależnie od stężenia ferrytyny w surowicy.

Innym celem naukowym wytyczonym w publikacji pt. *Exercise training and Vitamin C supplementation affects ferritin mRNA in leukocytes without affecting prooxidative/antioxidative balance in elderly women* była ocena wpływu sesji sześciotygodniowego treningu wytrzymałościowego z i bez sześciotygodniowej doustnej suplementacji witaminą C (1000 mg dziennie) na stres oksydacyjny i pojemność antyoksydacyjną osocza, a także na geny związane z odpowiedzią na stres komórkowy i metabolizm żelaza (FTH, FTL, PCBP1, PCBP2, TFRC, FOXO3a) w leukocytach.

Autorka pracy wykazała że sześciotygodniowy trening wspomagany codzienną suplementacją 1000 mg witaminy C nie wpłynął na równowagę prooksydacyjno-antyoksydacyjną osocza, ale spowodował zmiany w poziomach mRNA genów związanych z metabolizmem żelaza i jednocześnie związanych z homeostazą prooksydacyjno-antyoksydacyjnej komórki (FTH, FTL) u starszych kobiet. Jednak pozostałe wnioski Autorki pracy wzbudzają moje wątpliwości. Czy w pełni uzasadnione jest twierdzenie, że suplementacja witaminą C miała większy wpływ na ekspresję genów (i może pośrednio wskazywać na niższy stres oksydacyjny w komórkach) w porównaniu z jej wpływem na równowagę prooksydacyjno-antyoksydacyjną osocza? Czy wpływ suplementacji witaminą C

na poziom mRNA ferrytyny może wskazywać na pozytywny jej wpływ na adaptację do treningu u starszych kobiet podczas kolejnych sześciu tygodni treningu? Czy stosowanie suplementacji w późniejszym okresie (nie rozumiem określenia „późniejszy czas”) treningowym spowodowało istotne zmiany w masie ciała, masie mięśniowej i mRNA FTL, przy czym nie stwierdza się różnic pomiędzy grupami? I ostatnia uwaga Autorki dotycząca wątpliwości suplementacji witaminą C przy poziomie niewykazującym niedoboru. Myślę, że to spostrzeżenie nie budzi wątpliwości od wielu lat i jeśli są wątpliwości, to raczej dotyczą one tylko Sportowców. W moim przekonaniu, gdyby Autorka pracy pokazała przebieg zmian w czasie i równocześnie pomiędzy grupami, zdecydowanie łatwiejsza byłoby zrozumienie i interpretacji odnotowanych w badaniach zmian (dwuczynnikowa analiza wariancji ANOVA, ponieważ Autorka mierzyła dwa czynniki wpływające na badane kobiety). Moim zdaniem, część zawartych wniosków w artykule to raczej pewnego rodzaju spekulacje Autorów badania. Natomiast należałoby podkreślić w podsumowaniu pracy, brak efektu 12 tygodniowego programu treningowego na poziom VO_{2max} badanych kobiet w wieku 60-80 lat, co sugeruje, iż wyznaczony bodziec wysiłkowy w eksperymencie był prawdopodobnie za słaby. Ponadto brakuje w artykule informacji o samych prowadzonych sesjach treningowych, czy były nadzorowane, jak wyglądała frekwencja uczestniczek. Również metodyka pracy była dla mnie nie w pełni jasna, należało zaznaczyć, że są to badania randomizowane w układzie krzyżowym „cross-over”, i wyraźnie wskazać, która grupa była grupą kontrolną.

Ostatnim wyszczególnionym przez Doktorantkę celem w komentarzu do artykułów była próba wychwycenia optymalnych genów referencyjnych do analizy zmian ekspresji genów dla treningu wytrzymałościowego. Osiągnięcie tego celu wiązało się z realizacją przez Doktorantkę badań, które zostały szczegółowo opisane w artykule pt. *Identification of Optimal Reference Genes for qRT-PCR Normalization for Physical Activity Intervention and Omega-3 Fatty Acids Supplementation in Humans*. Doktorantka podjęła się próby identyfikacji stabilnie wyrażonych genów w leukocytach zdrowych, aktywnych fizycznie mężczyzn, które miałyby zostać wykorzystane jako stałe geny referencyjne. Geny analizowano przed i po 12 tygodniach treningu wytrzymałościowego w połączeniu z suplementacją kwasami tłuszczowymi omega-3 w celu oceny ich wpływu na wydolność fizyczną. Pośród pięciu postawionych w komentarzu celów naukowych przez Doktorantkę, ten ostatni, wydaje się za najbardziej wymagający i trudny do realizacji. Zastosowanie metody realtime RT-PCR, pozwala na obserwację procesu powielania materiału genetycznego w czasie rzeczywistym, co umożliwia szybkie i dokładne wykonanie pomiaru ilości materiału genetycznego obecnego w badanych próbkach. Jednak przy

takich badaniach istnieje zawsze ryzyko, że podczas kolejnych etapów przygotowywania prób, aby oznaczyć liczby transkryptów badanych genów, może dochodzić do zmian ilości materiału genetycznego, których najczęstszą przyczyną, ale nie jedyną, jest różna wydajność izolacji mRNA. Stąd istnieje potrzeba normalizacji wyników pomiędzy analizowanymi próbkami, poprzez wykorzystanie genu referencyjnego (normalizującego). Oznaczanie ilościowe, najczęściej w odrębnych reakcjach, genu badanego i normalizującego w danej próbce pozwalają dostarczyć pewności, że wszelkie zmiany w ilości materiału genetycznego podczas badania dotyczą w takim samym stopniu obydwu genów. Aby gen referencyjny był dogodnym wzorcem, w stosunku do którego można oznaczać ilości mRNA innych genów, musi charakteryzować się stałym, nieregulowanym poziomem ekspresji w danej tkance. I właśnie Doktorantka w swojej ostatniej pracy podjęła się oceny najbardziej stabilnych genów referencyjnych wykorzystując przy tym internetowe narzędzie programowe RefFinder, które integruje algorytmy z NormFinder, BestKeeper i geNorm, a także porównawczą metodę delta-Ct. Uzyskane w eksperymencie wyniki badań Doktorantka ujęła w postaci wniosków, które wskazują że analizowane geny GAPDH, TUBB i HPRT mogą być odpowiednimi genami referencyjnymi dla badań obejmujących trening fizyczny i suplementację omega-3 u ludzi. Natomiast Autorka pracy nie zaleca stosowania ACTB jako genu referencyjnego, w oparciu o własne ustalenia, a także dane przedstawione przez innych Autorów. Niemniej, Doktorantka sugeruje potrzebę dalszego prowadzenia badań molekularnych w tym zakresie, szczególnie długoterminowych uwzględniających oczekiwany przebieg czasowy adaptacji wysiłkowej. Uzyskane wyniki badań przez Autorkę z całą pewnością pozwolą lepiej zrozumieć wzajemne oddziaływanie nienasyconych kwasów tłuszczowych z rodziny omega-3 (n-3 PUFA) a treningiem wytrzymałościowym oraz pozwolą przybliżyć wiedzę na temat sposobu współregulowania zmian na poziomach mRNA przez omawiane czynniki. Jak zauważyła sama Autorka, dużo pytań na ten temat pozostaje bez odpowiedzi. Nadal, bowiem niewiele międzynarodowych grup badawczych zajmuje się tym obszarem wiedzy, co sugeruje, że jest miejsce na ogromny rozwój immunologii wysiłkowej w nadchodzących latach.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Agata Grzybkowskiej stanowi oryginalne rozwiązanie kilku bardzo aktualnych i ważnych problemów badawczych związanych z molekularnymi mechanizmami adaptacji do wysiłku fizycznego. Generalnie, zdecydowana większość tez, twierdzeń i poglądów wyrażonych w artykułach jest bardzo trafna i rzetelna. Komentarz do omawianych artykułów, napisany został przez Doktorantkę w sposób zwięzły, logiczny i interesujący. Pod względem formalnym praca doktorska przygotowana

została poprawnie, choć wykazuje drobne usterki w części dotyczącej komentarza artykułów. Prowadzone przez Doktorantkę dyskusje w załączonych artykułach wchodzących w cykl publikacji pod wspólnym tytułem *Molekularne mechanizmy adaptacji do wysiłku fizycznego – zmiany ekspresji wybranych genów w leukocytach*, dowodzą o pogłębionej wiedzy w zakresie zmian powysiłkowych i potreningowych zachodzących na poziomie molekularnym u sportowców czy osób aktywnych fizycznie. Ponadto świadczą o dojrzałości i umiejętności Doktorantki. Recenzowana praca spełnia wszystkie kryteria właściwe dla rozpraw doktorskich, co uzasadnia postawienie wniosku o przyjęcie rozprawy doktorskiej, dopuszczenie jej do publicznej obrony i kontynuowanie czynności w ramach przewodu doktorskiego Pani mgr Agaty Grzybkowskiej.


KIEROWNIK ZAKŁADU
Żywności i Żywienia
prof. AWF dr hab. Joanna Karolkiewicz