

Wrocław, 28 września 2023 r.

Prof. dr hab. Małgorzata Słowińska-Lisowska
Zakład Biologicznych i Medycznych Podstaw Sportu
Akademia Wychowania Fizycznego
im. Polskich Olimpijczyków we Wrocławiu

Recenzja

**rozprawy doktorskiej mgr Agaty Grzybkowskiej
pt. „Molekularne mechanizmy adaptacji do wysiłku fizycznego
- zmiany ekspresji wybranych genów w leukocytach”**

Promotor rozprawy: Prof. dr hab. Jędrzej Antosiewicz

Podstawa prawna opracowania recenzji

Recenzja rozprawy naukowej została wykonana na podstawie Uchwały Rady Kolegium Naukowego Akademii Wychowania Fizycznego i Sportu im. Jędrzeja Śniadeckiego w Gdańsku, zgodnie z którą zostałam powołana na recenzenta rozprawy doktorskiej mgr Agaty Grzybkowskiej zatytułowanej „Molekularne mechanizmy adaptacji do wysiłku fizycznego - zmiany ekspresji wybranych genów w leukocytach”.

Doktorantka, korzystając z możliwości stworzonej przez ustawę o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r., przygotowała spójny tematycznie zbiór artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych posiadających wskaźnik Impact Factor, a tym samym indeksowanych we wszystkich bibliograficznych bazach danych, co spełnia kryteria określone w ww. ustawie.

Praca na stopień doktora nauk o kulturze fizycznej przygotowana przez Panią mgr Agatę Grzybkowską obejmuje monotematyczny cykl publikacji naukowych składający się z trzech artykułów pod wspólnym tytułem „**Molekularne mechanizmy adaptacji do wysiłku fizycznego - zmiany ekspresji wybranych genów w leukocytach**”.

W skład cyklu wchodzi trzy oryginalne publikacje:

1. **Grzybkowska A.**, Anczykowska K., Ratkowski W., Aschenbrenner P., Antosiewicz J., Bonisławska I., Żychowska M. (2019). Changes in serum iron and leukocyte mRNA levels of genes involved in iron metabolism in amateur marathon runners-effect of the running pace. *Genes*, 10(6), 460. *Genes* 2019: **3,759 IF; 100 MEiN**.
2. Żychowska M., **Grzybkowska A.**, Wiech M., Urbański R., Pilch W., Piotrowska, A., Czerwińska-Ledwig O., Antosiewicz J. (2020). Exercise training and Vitamin C supplementation affects ferritin mRNA in leukocytes without affecting prooxidative/antioxidative balance in elderly women. *International Journal of Molecular Sciences, IJSM* 21(18), 6469, 2020: **5,924IF; 140 MEiN**.
3. **Grzybkowska A.**, Anczykowska K., Antosiewicz J., Olszewski S., Dzitkowska-Zabielska M., Tomczyk M. (2023). 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 IJSM*, 24(7), 6734. 2023: **6,208 IF; 140 MEiN**

Odbitki ww. publikacji zostały dołączone do manuskryptu pracy doktorskiej.

Sumaryczna punktacja przedstawionego osiągnięcia naukowego Pani Mgr Agaty Grzybkowskiej w postaci monotematycznego cyklu trzech publikacji naukowych wynosi **15,891 IF, 380 punktów MEiN**.

Doktorantka jest pierwszym autorem dwóch publikacji i zgodnie z oświadczeniami pozostałych autorów miała 50% udział w przygotowaniu projektu badawczego, przeprowadzeniu badań, analizie i interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu. W jednym artykule jest drugim autorem i zgodnie z oświadczeniami współautorów miała 35% udział w przygotowaniu projektu badawczego, przeprowadzeniu badań, analizie i interpretacji wyników, przygotowaniu manuskryptu.

Pisemne zgody współautorów zostały dołączone do pracy.

W mojej opinii powinna pojawić się w oświadczeniu współautorów adnotacja, że wyrażają zgodę na umieszczenie publikacji ich współautorstwa w cyklu monotematycznych prac będących podstawą do ubiegania się o stopień doktora.

Należy zauważyć, iż prace eksperymentalne Doktorantki zostały opublikowane w wysokopunktowanych, prestiżowych czasopismach o zasięgu międzynarodowym: *International Journal of Molecular Sciences* (dwie prace) oraz *Genes* (jedna praca.) Praca opublikowana w 2019 roku w czasopiśmie *Genes* była do tej pory już 8 razy cytowana, a praca opublikowana w *International Journal of Molecular Sciences* w 2020 - 4 razy (wg

Web of Science na dzień 6.08.2023), co niewątpliwie świadczy o ich dużej wartości naukowej. Publikacje w takich renomowanych periodykach wymagają niewątpliwie dużego doświadczenia w przygotowaniu koncepcji eksperymentu badawczego oraz redagowaniu manuskryptu. Dlatego też 50% czy 35% udział Doktorantki w pracy zespołowej uważam za wysoki i wystarczający do ubiegania się o uzyskanie stopnia doktora w oparciu o cykl publikacji.

Należy podkreślić fakt, że projekt badawczy Pani Magister był finansowany ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego N RSA4 06754: „Rozwój sportu akademickiego” (publikacje 1 i 2) oraz z Konkursu Preludium 16 Narodowego Centrum Nauki o numerze 2018/31/N/NZ7/02962 (publikacja 3).

Umiejętność pozyskiwania przez Doktorantkę środków zewnętrznych na realizację projektu badawczego, w szczególności z Narodowego Centrum Nauki, zasługuje na wyróżnienie. Należy podkreślić, iż koncepcja badań została poddana ocenie merytorycznej ekspertów z NCN i wyrażono zgodę na jej finansowanie.

Wszystkie projekty badawcze przeprowadzone przez Panią Magister uzyskały zgodę Komisji Bioetycznej (NKBBN/448/2016, KB-10/16, NKBBN/628/2019).

Moim zdaniem ocena rozprawy doktorskiej przygotowanej na podstawie opublikowanych prac naukowych dotyczących jednego wiodącego tematu wymaga od recenzenta odmiennego niż w klasycznych rozprawach podejścia do takiej dysertacji z uwzględnieniem nieco innych aspektów. Publikacje zamieszczone w czasopismach posiadających wysoki współczynnik oddziaływania IF poddano już ocenie pod względem merytorycznej poprawności przez recenzentów będących specjalistami z obszaru badawczego, którego one dotyczyły.

Poszukiwanie molekularnych podstaw adaptacji do wysiłku fizycznego jest dużym wyzwaniem dla badaczy zajmujących się genetyką. Pomimo wielu badań z tego obszaru nadal jest wiele niejednoznaczności i wątpliwości, które pojawiają się w tego typu analizach.

Eksperyment Doktorantki, który ma przede wszystkim charakter poznawczy, z pewnością jest oryginalnym i nowatorskim projektem badawczym, istotnym z punktu widzenia rozwoju nauk o kulturze fizycznej oraz nauk o zdrowiu. Wydaje się, że znaczenie aplikacyjne przedstawionych badań na dzień dzisiejszy jest niejednoznaczne i z pewnością wymaga jeszcze wielu analiz, które może w przyszłości pozwolią optymalizować stosowane obciążenia treningowe oraz dobierać dawki i czas stosowania wybranych substancji ergogenicznych. Z pewnością badania te mogą być inspiracją do dalszych projektów

naukowych związanych z personalizacją doboru obciążeń treningowych oraz stosowanych suplementów diety. Badania dotyczące potencjalnych wskaźników molekularnych mogących znaleźć zastosowanie w procesie treningowym, zarówno w sporcie klasyfikowanym, jak i amatorskim, wydają się bardzo istotne zarówno z punktu widzenia poznawczego, jak i aplikacyjnego.

Rozprawę doktorską Mgr Agaty Grzybkowskiej stanowi 65-stronnicowy wydruk komputerowy będący podsumowaniem trzech artykułów, zawierający ponadto oświadczenia współautorów publikacji oraz odbitki prac.

We wprowadzeniu Autorka w oparciu o dane z piśmiennictwa uzasadnia cel swoich badań.

Doktoranta w swojej dysertacji sformułowała pięć celów naukowych badań. W mojej ocenie należało zrehabilitować ogólny cel wszystkich badań będących podstawą do przygotowania dysertacji. Moje pewne wątpliwości budzi też użycie w celu pierwszym i czwartym słowa „wpływ”. Uważam, że bardziej precyzyjne w języku polskim jest użycie słowa „zależność”. Zastosowane narzędzia statystyczne w większym stopniu oceniały bowiem zależność pomiędzy badanymi zmiennymi.

Oczywiście jest to moja drobna uwaga, niemająca istotnego znaczenia dla wartości merytorycznej rozprawy.

Doktorantka w swojej dysertacji nie opracowała rozdziału „Materiały i metody”. W pracach opartych na cyklu publikacji spotyka się takie opracowanie. Oczywiście dołączone odbitki prac pozwalają czytelnikowi zapoznać się dokładnie z bardzo szczegółowym opisem grup badanych osób oraz zastosowanych metod i narzędzi badawczych.

Pani Magister w swojej dysertacji dokonała tylko pewnego rodzaju streszczenia trzech publikacji. Opisała najważniejsze aspekty dotyczące zarówno zastosowanej metodologii, jak i uzyskanych wyników badań.

W pierwszej publikacji do najważniejszych wyników można zaliczyć wykazanie po biegu maratońskim istotnych zmian w ekspresji genów związanych z metabolizmem żelaza (*PCBP1*, *PCBP2*, *FTL*, *FTH*, *TFRC*).

Zmiany w poziomach mRNA i białka wystąpiły w różnych punktach czasowych (odpowiednio: bezpośrednio i 3 godziny po biegu). Stężenie ferrytyny nie uległo zmianie, podczas gdy liczba transkryptów w leukocytach znacznie się zmniejszyła. Wykazano również, że tempo biegu może wpływać na ekspresję mRNA. Wyniki mogą wskazywać, że zmiany w mRNA genów zaangażowanych w metabolizm żelaza zachodziły niezależnie od stężenia żelaza i ferrytyny w surowicy.

Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorantka swój eksperyment przeprowadziła na grupie 26 osób, które brały udział w biegu maratońskim i wyraziły zgodę na uczestnictwo w badaniach oraz kilkakrotne pobieranie krwi, co z pewnością było dużym wyzwaniem organizacyjnym dla badaczy.

W drugiej publikacji wykazano, że 6-tygodniowy trening zastosowany u starszych kobiet, wspomagany suplementacją witaminy C, nie wpływał na równowagę prooksydacyjno-antyoksydacyjną, ale znacząco zmniejszał mRNA łańcucha ciężkiego ferrytyny (*FTH*) i łańcucha lekkiego ferrytyny (*FTL*) w leukocytach. Autorzy sugerują, że trening zdrowotny w połączeniu z suplementacją witaminy C może spowodować obniżenie ekspresji dwóch ważnych genów antyoksydacyjnych (*FTH*, *FTL*).

W trzecim eksperymencie czterdziestu zdrowych, aktywnych fizycznie mężczyzn poddano 12-tygodniowej suplementacji kwasem eikozapentaenowym (EPA) i kwasem dokozaheksaenowym (DHA) oraz wysiłkowi wytrzymałościowemu. Wykazano, że *GAPDH* jest najbardziej stabilnym genem. Wszystkie analizowane algorytmy uznały *ACTB* za gen o najmniej stabilnej ekspresji. Sugeruje się, że w tego typu badaniach, w celu uzyskania najbardziej wiarygodnych wyników, należy połączyć trzy geny o najbardziej stabilnej ekspresji, a mianowicie: *GAPDH*, *TUBB* i *HPR1*.

W dysertacji pominięto rozdział „Dyskusja”, ale należy podkreślić, iż każdy artykuł zawiera ten rozdział.

Czasami jednak w dysertacji doktorskich opartych na cyklu monotematycznych publikacji spotyka się próbę całościowego wyjaśnienia mechanizmów występowania obserwowanych zależności w kontekście wspólnego tytułu dysertacji.

Kolejnym rozdziałem w rozprawie są „Wnioski”. Moim zdaniem Doktorantka powinna ten rozdział zatytułować „Podsumowanie wyników badań”. W dysertacji brakuje mi wniosku poznawczego i aplikacyjnego wynikającego z podsumowania cyklu trzech publikacji.

Podczas obrony chciałabym, żeby Pani Magister przedstawiła mi próbę takiego wnioskowania w kontekście tytułu dysertacji.

Rozprawa zawiera też rozdział „Streszczenie”. Jest ono zredagowane zarówno w języku polskim, jak i angielskim.

Z obowiązku Recenzenta przedstawię drobne nieprawidłowości które zawarto w przedstawionej mi do oceny pracy doktorskiej.

Moje wątpliwości budzi sposób przedstawienia noty bibliograficznej publikacji, które posiadają już nadany nr tomu i numery stron i w związku z tym nie powinny zawierać

numeru DOI (nr ten jest nadawany przez redakcję po przyjęciu pracy do druku, a przed jej umieszczeniem w określonym numerze periodyku naukowego). W dysertacji są też liczne błędy edytorskie np. str. 4 powinno być „race”, a na stronie 8 – „metabolizmie”.

Należy podkreślić, iż większość moich uwag ma charakter dyskusyjny i nie wpływa w istotnym stopniu na wartość merytoryczną rozprawy doktorskiej.

Trzeba też zauważyć, że jest to praca doktorska z cyklu prac ocenionych, recenzowanych przez recenzentów zewnętrznych i przyjętych do druku. Taka forma przedstawienia rozprawy doktorskiej z mojego punktu widzenia zasługuje na wyróżnienie. Tego typu rozprawy doktorskie mają niewątpliwie duże walory poprawności metodologicznej, a wyniki badań mogą być szybciej udostępnione i cytowane przez innych badaczy, o czym świadczą również cytowania publikacji Doktorantki.

Po zapoznaniu się z rozprawą doktorską stwierdzam, że rozprawa ta spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom na stopień naukowy doktora zawarte w ustawie z dn. 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2016 r. poz. 882, z późn. zm.). Dlatego też wnoszę do Rady Naukowej Akademii Wychowania Fizycznego i Sportu im. Jędrzeja Śniadeckiego w Gdańsku o dopuszczenie Pani Mgr Agaty Grzybkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska kwalifikuje doktorantkę do nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauk o kulturze fizycznej

Ponadto ze względu na nowatorski i oryginalny charakter badań Pani Magister Agaty Grzybkowskiej wnioskuję do Rady Naukowej Akademii Wychowania Fizycznego i Sportu o wyróżnienie rozprawy.

Małgorzata Słowińska-Lisowska