



O C E N A

pracy doktorskiej mgr. Mateusza Bosiackiego

**pt. „*Metabolizm energetyczny i biogeneza mitochondriów w mięśniach szczurów
poddanych imersji w zimnej wodzie*”**

Fizjoterapia, jako dynamicznie rozwijająca się dziedzina nauki, nieustannie poszukuje innowacyjnych rozwiązań, mających na celu optymalizację procesów rehabilitacyjnych i poprawę jakości życia pacjentów. W obliczu rosnącej liczby schorzeń układu mięśniowo-szkieletowego oraz neurologicznego, coraz większą uwagę poświęca się metodom terapeutycznym, które wykraczają poza leczenie farmakologiczne i chirurgiczne. Jednym z takich obszarów zainteresowania są zabiegi wykorzystujące krioterapię tj. metody wykorzystujące oddziaływanie niskich temperatur na organizm żywy. Choć metoda krioterapii jest stosowana od lat w różnych praktykach medycznych, to dopiero w ostatnich latach zaczęto prowadzić systematyczne badania naukowe nad jej mechanizmem działania. Wiadomo, że zanurzenie w zimnej wodzie aktywuje układ współczulny oraz zwiększa wydzielanie kortykotropiny, endorfiny i innych substancji neuromodulujących, co poprawia kurczliwość mięśni, sprzyja regeneracji tkanek oraz poprawia nastrój i samopoczucie psychiczne. Ponadto wiadomo, że zanurzenie w zimnej wodzie wywołuje wiele zmian adaptacyjnych w sygnalizacji wewnątrzkomórkowej - zmniejsza ekspresję niektórych cząsteczek miRNA zaangażowanych we wzrost i regenerację mięśni, zmniejsza stan zapalny poprzez osłabienie procesów metabolicznych i zwężenie naczyń. Jednak badania w tym obszarze są bardzo ubogie. Dokładniejsze poznanie zmian w sygnalizacji wewnątrzkomórkowej, które rozwijają się w komórkach mięśni na poziomie molekularnym, jest niezbędne dla prawidłowego wykorzystywania tej metody w praktykach klinicznych. Niniejsza praca doktorska doskonale wpisuje się w nurt takich badań.

Przedłożona do recenzji praca doktorska jest pracą oryginalną. Ma powszechnie akceptowany układ. Zawiera 109 stron oprawionego, jednostronnego wydruku komputerowego formatu A4. Składa się z *Wprowadzenia* oraz *Przeglądu Piśmiennictwa* przedstawionego łącznie na 32 stronach, *Hipotez Badawczych* oraz *Celu Pracy* obejmujących 1 stronę, z 10-stronicowego opisu *Materiałów i Metodyki Badań*, rozdziału *Wyniki* przedstawionego na 21 stronach, zawierającego 22 ryciny, z 15-stronicowej *Dyskusji* oraz *Wniosków*. Rozprawę zamyka obszerny wykaz cytowanego *Piśmiennictwa* w liczbie 256 pozycji. Pracę uzupełnia *Wykaz Skrótów* i *Spis Treści*, które znajdują się na początku dysertacji oraz *Streszczenie* w języku polskim oraz angielskim, a także *Spis Rycin* i *Spis Tabel*, które umieszczono w ostatniej części pracy. Do pracy jest załączony *Aneks* zawierający wydruk publikacji opublikowanej w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences* (2024), IF = 4,9, MNiSW = 140, w której opublikowano wyniki badań przedstawione w niniejszej dysertacji oraz dodano analizę



immunoenzymatyczną oraz immunohistochemiczną białek. Praca została przygotowana w sposób bardzo staranny - nie mam zastrzeżeń do jej kompozycji.

Pierwszą, krótką część pracy stanowi *Wprowadzenie*, w której Autor zaznajamia Czytelnika z tematyką pracy doktorskiej i wskazuje zimne kąpiele jako istotny czynnik hartujący, wpływający pozytywnie na psychiczne i fizyczne zdrowie człowieka.

Drugi rozdział to *Przegląd Piśmiennictwa*. Został on podzielony na 9 podrozdziałów. Przedstawiono tu aktualny stan wiedzy na temat budowy, funkcji i dynamiki mitochondriów. Szczegółowo opisano proces fuzji oraz fizji mitochondriów z uwzględnieniem znaczenia białek biorących udział w tych procesach, tj. mitofuzyny (Mfn)1 i 2, białka Opa1, Drp 1. Poziom tych białek jest przedmiotem badań niniejszej dysertacji. Wskazano również parametry, które mogą mieć wpływ na dynamikę mitochondriów, tj. stan energetyczny komórki oraz szlaki sygnalizacyjne, stres oksydacyjny. Opisano zależności zachodzące pomiędzy procesami biogenezy mitochondriów (wytwarzanie mitochondriów) a mitofagii mitochondriów (degradacja mitochondriów), które mają istotny wpływ na homeostazę komórki. Wskazano białka i szlaki sygnalizacyjne biorące udział w tych procesach. Jedno z białek, PGC-1 α , inicjujące transkrypcję i translację mitochondrialnego DNA tym samym inicjujące biogenezę mitochondriów, stanowiło przedmiot badań niniejszej dysertacji. Przedstawiono aktualny stan wiedzy na temat znaczenia dynamiki mitochondriów w komórkach mięśni, wskazując między innymi, że dysfunkcja dynamiki może być przyczyną patologii, np. zmian remodelingowych w sercu czy insulinooporności komórek. W dwóch ostatnich podrozdziałach zwięźle opisano znaczenie nukleotydów adenylowych jako ważnego parametru stanu energetycznego komórek. Analiza poziomu nukleotydów adenylowych był przedmiotem badań niniejszej dysertacji, w procesach metabolicznych komórek. Pięć rycin umieszczonych w tym rozdziale znacznie zwiększa przejrzystość tekstu i ułatwia lekturę. Rozdział *Przegląd Piśmiennictwa* napisany jest rzeczowo i starannie. Doktorant wykazał się znajomością aktualnej literatury. Umiejętnie wprowadził czytelnika w tematykę badań.

W rozdziale *Hipotezy Badawcze i Cel Pracy* Autor, w oparciu o wcześniejsze doniesienia literaturowe, przedstawił założenia pracy badawczej oraz szczegółowo wskazał rodzaje zaplanowanych eksperymentów. Hipotezy badawcze oraz cel pracy zostały prawidłowo sformułowane.

Kolejny rozdział dysertacji - *Materiał i Metody Badań* - został podzielony na 7 podrozdziałów. Autor opisał tu poszczególne etapy eksperymentów. Pierwszy krok podjętych badań stanowiły eksperymenty przeprowadzone na modelu szczurzym. Eksperymenty te zostały zaakceptowane przez Lokalną Komisję Etyczną ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Szczecinie. Starzejące się zwierzęta (15 tygodni), zarówno samce jak i samice, zostały poddane długotrwałej (9 tygodni), codziennej aktywności fizycznej polegającej na zanurzaniu zwierząt w wodzie o temperaturze komfortu cieplnego - 36°C oraz w zimnej wodzie, tj. o temp. 4°C. Zastosowano prawidłowe procedury mające na celu zminimalizowanie stresu zwierząt (zasada 3R): podczas pierwszego tygodnia eksperymentu czas zanurzenia zwierząt był krótszy – 2 minuty, i był codziennie wydłużany o 0,5 minuty do czasu maksymalnego 4 minut. Po ekspozycji zwierząt na wysiłek fizyczny szczury zostały poddane anestezji i pobrano tkankę mięśniową uda, którą zamrożono w temperaturze -80°C w celu przeprowadzenia dalszych badań. Po homogenizacji, za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej analizowano stężenie ATP, ADP, AMP oraz



adenozyny w mięśniach samców i samic. Na tej podstawie obliczono całkowitą pulę nukleotydów adenylanowych oraz wartość ładunku energetycznego adenylanów. Ponadto, za pomocą analizy qRT-PCR oceniano ekspresję mRNA PGC-1 α , Mfn1, Mfn2, Opa1 i Drp1, tj. mRNA białek zaangażowanych w dynamikę mitochondrialną. Dodatkowo, za pomocą analizy Western blot analizowano poziom ekspresji białka PGC-1 α . Metodyka wszystkich eksperymentów została opisana prawidłowo. Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono prawidłowo, z zastosowaniem testu nieparametrycznego U Manna-Whitney'a. Podsumowując tę część pracy należy podkreślić, że materiał i metodyka badań zostały właściwie dobrane i pozwoliły na rozwiązanie założonego problemu badawczego. Badania te są kosztowne, wymagają specjalistycznej aparatury, a umiejętność ich przeprowadzenia wskazuje na wysoki potencjał Doktoranta w obszarze działalności naukowej.

Do tej części pracy mam jedną uwagę. W rozdziale *Materiał i Metody Badań* brakuje informacji dotyczącej sposobu wyznaczania całkowitej puli nukleotydów adenylanowych oraz wartości ładunku energetycznego adenylanów. Informacje te, ale nieco ubogie, są umieszczone w ostatnich akapitach rozdziału 2 – jednak powinny być opisane zdecydowanie dokładniej w rozdziale *Materiał i Metody Badań*.

Wyniki badań zostały opisane w formie 11 podrozdziałów i przedstawione w postaci 22 rycin obrazujących wykresy. Uzyskane wyniki są interesujące, wykazano bowiem, że pływanie starzejących się zwierząt w zimnej wodzie powoduje zwiększenie tempa metabolizmu energetycznego mięśni ponieważ poziom ATP, ADP, TAN oraz AEC zwiększyły się statystycznie istotnie, podczas gdy poziom AMP obniżył się. Trening ten poprawia również proces biogenezy i dynamiki mitochondriów, ponieważ obserwowano statystycznie istotny wzrost poziomu mRNA białek Mfn1, Mfn2, Opa1 i Drp1. U zwierząt poddanych treningowi w ciepłej wodzie różnice w poziomie ekspresji poszczególnych białek oraz mRNA były słabiej wyrażone.

Mam kilka uwag do tej części pracy:

- 1) Autor zmienił granice progów statystycznych - W rozdziale 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6 w opisie podał, że symbol „**” oznacza $p \leq 0,001$, podczas gdy w podpisie ryciny podaje, że $p \leq 0,005$. W rzeczywistości, przyjmuje się, że dla tego symbolu $p \leq 0,01$. Jeśli celowo dokonał przesunięcia progu powinien to dokładnie opisać i uzasadnić oraz powinno być to stosowane w całej pracy (obecnie nie jest).
- 2) Rozdział 5.8 – Autor używa błędnego symbolu „ \leq ” zamiast „=” . W ten sposób powstają kolejne progi statystyczne, np. $p \leq 0.007$, $p \leq 0.0002$, $p \leq 0.001$ czy $p \leq 0.02$. Podobnie jest w rozdziale 5.9, 5.10, 5.11.
- 3) Doktorant podaje (np. na str. 51, ostatni akapit rozdziału 5.1), że obserwowano statystycznie istotne różnice pomiędzy obu płciami: „...Odnotowano wyższe wartości stężeń ATP u samców względem samic z obu grup badanych”... - Na jakiej podstawie wysnuto takie wnioski? – na wykresie tego nie widać. Jaki test statystyczny tu użyto biorąc pod uwagę, że analizujemy tu 2 parametry (temperatura wody i płeć)?
- 4) Rozdział 5.4 – Autor używa błędnego skrótu „ADP” zamiast „Ado”



- 5) Podpis Ryciny 19 i 20 – jest wtrącone zdanie w języku angielskim
- 6) Istnieje rozbieżne nazewnictwo – w rozdziale 5.5 jest tytuł: „Całkowita pula nukleotydów adenylanowych”, natomiast w podpisie ryciny 15 widnieje: „Pula nukleotydów adeninowych...”.
- 7) Rycina 16, 19 – symbol „**” jest umieszczony nieprawidłowo
- 8) Rozdział 5.11 – brakuje „p” przy wartości 0.048
- 9) Błąd literowy: Rozdział 5.3 – „ $p = p \leq 0,001$ ”

Uzyskane wyniki badań Doktorant umiejętnie przedyskutował w kolejnym rozdziale – *Dyskusja*, w oparciu o aktualny stan wiedzy w tym zakresie. Rozdział ten jest bardzo obszerny i został podzielony na 3 części, co ułatwia lekturę. W pierwszej części Autor podsumował uzyskane wyniki badań, a w kolejnych dwóch częściach przedyskutował swoje wyniki w kontekście istniejących już doniesień naukowych. Na umiejętność krytycznego myślenia wobec wyników własnych wskazuje m.in. fakt, że Doktorant w swoich rozważaniach uwzględnił doniesienia wskazujące zarówno pozytywne jak i negatywne (str. 76) efekty działania niskich temperatur na organizm. Znajomość rozległego piśmiennictwa i umiejętność jego wykorzystania do oceny wyników własnych badań oraz czytelna prezentacja złożonej problematyki świadczą o doskonałym przygotowaniu teoretycznym Autora do pracy naukowej.

Wnioski przeprowadzonych badań zostały zawarte w 3 punktach. Są one właściwie sformułowane, chociaż brakuje mi ostatniego, podsumowującego wniosku, nawiązującego do tytułu pracy, który mógłby brzmieć: „Zanurzenie starzejących się szczurów w zimnej wodzie ma wpływ na metabolizm energetyczny i biogenezę mitochondriów komórek mięśniowych” lub podobnie. Niemniej jednak wnioski, sformułowane w niniejszej postaci, dają odpowiedź na założoną hipotezę badawczą.

Praca zaopatrzona jest w bogate piśmiennictwo, które jak wcześniej wspomniałam, zawiera 256 pozycji, z których aż 88% stanowią doniesienia opublikowane w latach 2000-2024.

Praca zawiera streszczenie pracy zarówno w języku polskim, jak i angielskim. Oba rozdziały precyzyjnie odzwierciedlają treść pracy.

W rozdziale *Aneks* jest przedstawiony opublikowany artykuł, w którym Doktorant jest pierwszym Autorem. Jak wspomniałam powyżej, artykuł został opublikowany w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences* (2024), IF = 4,9, MNiSW = 140. Przedstawia wyniki badań pochodzące z niniejszej dysertacji poszerzone o immunoenzymatyczną i immunohistochemiczną analizę białek.

Dysertacja jest bardzo dobrze przygotowana pod względem gramatycznym i edytorskim. Pojawiło się kilka błędów literowych, ale są one bardzo nieliczne, nie mają znaczenia merytorycznego i nie wpływają na jakość dysertacji.

Podsumowując, przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr. Mateusza Bosiackiego, zatytułowana: „Metabolizm energetyczny i biogeneza mitochondriów w mięśniach szczurów poddanych imersji w zimnej wodzie” została prawidłowo zaplanowana i zrealizowana pod względem metodycznym. Uzyskane wyniki są nowatorskie i stanowią poszerzenie dotychczasowej wiedzy na



temat wpływu kąpiele w zimnej wodzie na funkcjonowanie mitochondriów u starzejących się szczurów. Uzyskane wyniki badań Doktorant przedyskutował wnikliwie i wyczerpująco. Wskazane przeze mnie uwagi, nie mają wpływu na całość pracy, ale, mam nadzieję, że będą pomocne w dalszej pracy badawczej. Zaprezentowaną pracę doktorską oceniam pozytywnie. Moim zdaniem spełnia ona wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim w dziedzinie: nauki medyczne i nauki o zdrowiu, w dyscyplinie: nauki medyczne.

Z pełnym przekonaniem uważam, że przedłożona rozprawa spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim w myśl ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce t.j. (Dz.U. 2023 poz. 742.). Zwracam się zatem do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Medyczne PUM o dopuszczenie mgr. Mateusza Bosiackiego do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Joanna Listos

Lublin, dn. 31.08.2024 r.