

Akademia Wychowania Fizycznego w Krakowie
Instytut Nauk Biomedycznych
al. Jana Pawła II 78
31-571 Kraków

Kraków, 28.11.2020

dr hab. Magdalena Więcek, prof. AWF
Kierownik Zakładu Fizjologii i Biochemii
magdalena.wiecek@awf.krakow.pl
tel.: +48 507857329, +48 126831223

RECENZJA

rozprawy doktorskiej **mgr Olgi Marii Bugaj** pt.: „Zmiany fluorescencji NADH w skórze pod wpływem wysiłku fizycznego u wysokowytrenowanych sportowców badane metodą Flow Mediated Skin Fluorescence”, przygotowanej pod kierunkiem dr hab. Jacka Zielińskiego, prof. AWF w Poznaniu. Recenzję sporządzono w oparciu o uchwałę Rady Naukowej AWF w Poznaniu z dnia 13.10.2020 roku.

Podstawę rozprawy doktorskiej stanowi cykl trzech powiązanych tematycznie publikacji naukowych, w tym jednej pogłądowej i dwóch prac oryginalnych:

1. Flow-Mediated Skin Fluorescence method for non-invasive measurement of the NADH at 460 nm – a possibility to assess the mitochondrial function. *Postępy Biologii Komórki* 44 (4): 333-52, 2017.
2. The effect of exercise on the skin content of the reduced form of NAD and its response to transient ischemia and reperfusion in highly trained athletes. *Frontiers in Physiology* 10: 600, 2019.
3. The effect of a 7-week training period on changes in skin NADH fluorescence in highly trained athletes. *Applied Sciences* 10: 5133, 2020.

Wskazane prace zostały opublikowane w latach 2017-2020, wszystkie w recenzowanych czasopismach naukowych ujętych w wykazie opracowanym w 2018 roku przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego i jednocześnie indeksowanych w bazie JCR (Journal Citation Reports). Łączna suma punktów przypisana wymienionym pracom to 185 punktów ministerialnych oraz IF=5,988 (dane na podstawie oceny bibliometrycznej z 26.11.2020 r., zweryfikowane przez Dyrektora Biblioteki AWF w Krakowie). Punktacja ta nieznacznie różni się od podanej przez Doktorantkę (MNiSW=190 pkt., IF=5,833). Być może Doktorantka bazowała na punktacji dostępnej w momencie ukazania się poszczególnych prac, opracowanej dla poprzedzającego roku kalendarzowego.

We wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszym autorem. Prace badawcze prezentują wyniki jakie uzyskano w ramach badań zrealizowanych w Zakładzie Lekkiej Atletyki i Przygotowania Motorycznego w AWF w Poznaniu, będących częścią projektu B+R współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Inteligentny Rozwój 2014-2020. Do dokumentacji Doktorantka załączyła oświadczenia z wykazem zrealizowanych

przez Nią zadań, które pomimo braku określenia udziału procentowego, wskazują na Jej wiodącą rolę w przygotowaniu poszczególnych publikacji. Doktorantka była zaangażowana w realizację badań na każdym ich etapie. Opracowała podstawy teoretyczne dotyczące wykorzystanej metody, opracowała metodykę badań, uczestniczyła w ich wykonaniu, tworzeniu baz danych, analizie i interpretacji wyników, aż po przygotowanie poszczególnych publikacji. Każde oświadczenie zostało potwierdzone przez pozostałych współautorów.

Wszystkie prace są spójne tematycznie, zostały opublikowane w logicznej kolejności. Prace badawcze zostały poprzedzone publikacją pracy poglądowej, w której przedstawiono podstawy dotyczące funkcji mitochondriów oraz udziału NAD^+/NADH w procesach metabolicznych w różnych przedziałach komórkowych, dokonano także krótkiego przeglądu metod stosowanych do tej pory w badaniach struktury i aktywności metabolicznej mitochondriów. Przedstawiono również, w przejrzysty sposób, podstawy teoretyczne wykorzystanej metody FMSF oraz jednoznacznie zdefiniowano mierzone i wyliczane wielkości wraz z propozycją ich interpretacji.

Prace badawcze stanowią konsekwencję postawionego celu badań, który w autoreferacie Doktorantka sformułowała jako określenie zmian intensywności fluorescencji NADH w skórze pod wpływem pojedynczego wysiłku do odmowy oraz po 7 tygodniowym treningu w okresie przygotowawczym nową nieinwazyjną metodą Flow Mediated Skin Fluorescence u wysokowytrenowanych sportowców.

Tak sformułowany cel jasno wytycza i uzasadnia zadania badawcze oraz wykorzystane metody pomiarowe, które szczegółowo zostały opisane w pracach oryginalnych. Uważam jednak, że w celu badań można było podkreślić, że chodziło o próbę określenia zmian poziomu NADH w skórze w efekcie zastosowanych bodźców wysiłkowych (wysiłek/trening) na podstawie zmian intensywności fluorescencji z wykorzystaniem wskazanej nowej nieinwazyjnej metody.

W pracach oryginalnych poddano analizie wyniki uzyskane u osób reprezentujących wysoki poziom sportowy, było to 121 osób reprezentujących różne dyscypliny sportowe, które jednokrotnie wykonały test wysiłkowy o stopniowo narastającej intensywności oraz 41 osób, które poddano badaniom dwukrotnie w przygotowawczym okresie treningowym, powtarzając test stopniowany w odstępie 7 tygodniowym. Za każdym razem przed rozpoczęciem testu wysiłkowego oraz po jego zakończeniu rejestrowano, zmienną dla NADH intensywność fluorescencji o długości fali 460 nm. z komórek naskórka w obszarze przedramienia w odpowiedzi na wzbudzenie promieniowaniem ultrafioletowym o długości fali 340 nm. Dokonywano pomiaru bazowego oraz w okresie ischemii wywołanej okluzją tętniczą, a także w czasie reperfuzji. W tym celu wykorzystano urządzenie AngioExpert (Angionica, Łódź, Polska).

Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka potwierdziła postawione przez siebie hipotezy wnioskując, że:

1. Wysiłek fizyczny do odmowy modyfikuje metabolizm NADH zarówno bazowy, jak i mierzony podczas niedokrwienia i reperfuzji w komórkach skóry przedramienia, przesuując bazową fluorescencję NADH w kierunku wyższych wartości.
2. Trening w okresie przygotowawczym spowodował wzrost fluorescencji NADH w grupie sportowców wyczynowych, badanej przed i po wysiłku do odmowy, co może sugerować wzrost puli NAD w organizmie.

Badania mają przejrzystą i uzasadnioną konstrukcję, podyktowaną celem pracy. Wyniki badań zostały czytelnie zobrazowane graficznie i tabelarycznie. Liczebność w badanych grupach, w przypadku analizy całościowej wyników, bez podziału na podgrupy pod względem reprezentowanej dyscypliny, a jedynie ze względu na płeć, jest prawdopodobnie wystarczająca dla uzyskania wysokiej mocy testów statystycznych. Niestety Autorka nie wskazała ani w autoreferacie, ani w publikacjach jaka jest moc przeprowadzonych testów statystycznych, podając tylko wartość p (publikacja 2) lub p i wielkość efektu η^2 będącego miernikiem znaczenia klinicznego uzyskanych różnic (publikacja 3). W publikacji numer 3, zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji. Nie ma natomiast informacji na temat tego czy zostały spełnione warunki uprawniające do przeprowadzenia takiej analizy.

W prezentowanych pracach Doktorantka, opierając się na dobrze dobranych pozycjach piśmiennictwa naukowego, przedstawia podstawy teoretyczne podjęcia badań, a także dyskutuje i uzasadnia uzyskane wyniki, wiążąc zmiany intensywności fluorescencji uzyskane z komórek naskórka, świadczące o zmianie poziomu NADH (zmianie relacji NAD^+/NADH), ze zmianami metabolicznymi jakie zachodzą w mitochondriach podczas intensyfikacji tempa metabolizmu wywołanego wysiłkiem fizycznym oraz adaptacyjnymi zmianami stanu metabolicznego mitochondriów skóry pod wpływem treningu (zwiększenie puli NAD). Co cenne, Doktorantka w swoich pracach pokazuje również szereg ograniczeń związanych ze stosowaniem wskazanej metody.

W swoim autoreferacie Doktorantka nie ustrzegła się jednak pewnych pomyłek i niezgodności, jak również błędów edytorskich np.: „prac wskazujących”, zamiast wskazujących (strona 5), „redukowanej formy dinukleotydu nikotyamidoadeninowego” zamiast zredukowanej formy dinukleotydu nikotyamidoadeninowego (strona 4), czy „okluzję tętnicza”, zamiast tętniczą (strona 11), itp. W opisie metod badawczych Autorka napisała, że „Sportowcy w dniu badania przez 24 godziny poprzedzające test wysiłkowy nie mogli brać udziału w intensywnych sesjach treningowych”, podczas gdy w obu publikacjach wskazała, że uczestnicy badań nie mogli wykonywać intensywnych wysiłków fizycznych w czasie 48 godzin przed wysiłkiem testowym. Również sposób przedstawienia informacji na temat oznaczeń stężenia mleczanu był mylący i wskazywał na wykonywanie tych analiz w obu częściach projektu (wpływ wysiłku/wpływ treningu), podczas gdy stężenie mleczanu zostało przedstawione wyłącznie w pracy 3 (wpływ treningu).

Na stronie 5 Autorka podaje informację: „NADH jest syntetyzowany w cytoplazmie, mitochondriach i jądrze komórkowym, ale jego utlenianie zachodzi tylko w mitochondriach”, co nie jest

prawdą, gdyż NADH w warunkach anaerobowych ulega utlenieniu w reakcji redukcji pirogronianu do mleczanu, a reakcja ta ulega intensyfikacji m.in. po przekroczeniu progu mleczanowego w stopniowanym teście wysiłkowym zastosowanym przez Autorkę. I dalej na stronie 5 Autorka napisała: „NAD⁺/NADH będąc donorem i akceptorem jonów wodorowych ...”, podczas gdy to NAD⁺ jest akceptorem, natomiast NADH jest donorem elektronów i jonu wodorowego. Czy też na stronie 10: „aby cząsteczki NAD⁺ i NADH mogły się utleniać i redukować” – tutaj procesy powinny być wymienione w odwrotnej kolejności, to NAD⁺ ulega redukcji, a NADH utlenieniu. Podobny błąd pojawia się również w publikacji 3, gdzie Autorka wskazuje, że NAD⁺ to forma zredukowana, a NADH to forma utleniona (strona 2). Te reakcje nie powinny być mylone, ponieważ stanowią podstawę utleniania biologicznego i jednocześnie podstawę podjętego tematu. Wymieniając źródła NADH, oprócz glikolizy i cyklu Krebsa należało również wskazać reakcję utleniania hydroksyacylo-CoA w procesie β-oksydacji. Uważam, że jak na krótki, 13-stronnicowy autoreferat to dosyć dużo niedociągnięć.

Pomimo kilku krytycznych uwag, dokładna analiza treści publikacji daje podstawę do wysokiej oceny pracy doktorskiej mgr Olgi Bugaj. Uzyskane wyniki poszerzają wiedzę z zakresu nauk o kulturze fizycznej, mają również charakter aplikacyjny. Uzyskane wyniki wskazują na możliwość wykorzystania nieinwazyjnej metody FMSF jako badania pośrednio oceniającego zmiany metabolizmu NAD⁺/NADH indukowane wysiłkiem fizycznym oraz treningiem u sportowców, ale także w ocenie zmian w obrębie mikrokrążenia oraz funkcji komórek śródbłonna, co może być również pomocne w badaniu efektów terapii oraz treningu zdrowotnego. Wskazane byłoby kontynuowanie badań z rozszerzeniem zakresu analiz włącznie z równoczesną oceną metabolizmu mitochondriów w biopsjach tkankowych.

Uważam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone Ustawą z dnia 20.07.2018 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, w związku tym wnoszę do Rady Naukowej Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu wniosek o przeprowadzenie dalszych etapów postępowania i nadanie mgr Oldze Bugaj stopnia doktora w dyscyplinie nauk o kulturze fizycznej. Jednocześnie biorąc pod uwagę innowacyjny charakter badań wnoszę o wyróżnienie ocenianej pracy.

KIEROWNIK
Zakładu Fizjologii i Biochemii

dr hab. Magdalena Wiącek
profesor AWF