



Akademia Wychowania Fizycznego

im. Bronisława Czecha w Krakowie

Wydział Rehabilitacji Ruchowej

Instytut Nauk Podstawowych

Zakład Fizjologii Mięśni

Al. Jana Pawła II 78, 31-571 Kraków

tel.: +48 12 683 15 72 www.kfb.awf.krakow.pl

dr hab. Marcin Grandys prof. AWF

Kraków, 04.05.2020 r.

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Ewy Zarębskiej

pt.: "Zmiany osoczowego stężenia adenozyntrifosforanu u zawodników klasy mistrzowskiej w rocznym cyklu treningowym"

Strona | 1

Zawartość formalna rozprawy doktorskiej

Rozprawa doktorska mgr Ewy Zarębskiej oparta została o dwa opublikowane i powiązane ze sobą tematycznie artykuły naukowe, pod wspólnym tytułem: „Zmiany osoczowego stężenia adenozyntrifosforanu u zawodników klasy mistrzowskiej w rocznym cyklu treningowym”. Obydwie prace przygotowane były w ramach projektu naukowego nr 2013/09/B/NZ7/02556, sfinansowanego przez Narodowe Centrum Nauki, a opublikowane zostały w następujących czasopismach o zasięgu międzynarodowym:

1. *Plasma nucleotide dynamics during exercise and recovery in highly trained athletes and recreationally active individuals*, **BioMed Research International**, **2018**, doi: **10.1155/2018/4081802**.
2. *Alterations in exercise-induced plasma adenosine triphosphate concentration in highly trained athletes in a one-year training cycle*, **Metabolites**, **2019**, **9** (10 [230]), doi: **10.3390/metab09100230**.

W obydwu ww. pracach Doktorantka była pierwszym autorem oraz posiadała wiodący udział w ich powstaniu, co potwierdzone zostało przez oświadczenia wszystkich współautorów publikacji. Ponadto, wskaźniki bibliometryczne tych czasopism (70 pkt wg ministerialnego wykazu czasopism oraz wskaźnik oddziaływania IF 2.2 i 3.3 – oba czasopisma w Q2 w swojej kategorii) w mojej opinii są znaczące i zasługują na uznanie, szczególnie biorąc pod uwagę początkowy etap kariery naukowej Doktorantki.

Prezentacja rozprawy doktorskiej dokonana została w formie autoreferatu, napisanego w języku polskim i angielskim i obejmującego 27 stron maszynopisu wraz ze

spisem piśmiennictwa i streszczeniem, do którego dołączone zostały oświadczenia współautorów i kopie obydwu publikacji. Pod kątem wymagań formalnych, taki sposób prezentacji rozprawy doktorskiej nie rodzi najmniejszych zarzutów i w mojej opinii jest jak najbardziej prawidłowy.

Zawartość merytoryczna rozprawy doktorskiej

Strona | 2

Zagadnieniem stężenia ATP w osoczu podczas wysiłku fizycznego zajmowano się od dawna (prace z przełomu lat 60 i 70-tych XX wieku), ale stosunkowo mało było danych na temat znaczenia jego zmian. Dopiero w ostatnich dwóch dekadach okazało się, że ATP w przestrzeni pozakomórkowej pełni ważne role jako cząsteczka sygnalizacyjna, biorąc udział w dostarczaniu tlenu do pracujących mięśni, poprzez efekt wazodylatacyjny i sympatykolityczny. Stężenie ATP w erytrocytach jest ok. 3 tysiące razy wyższe niż w osoczu, więc uwalnianie nawet niewielkich ilości z krwinek czerwonych może znacznie podnosić jego poziom w osoczu. Zwiększenie stężenia ATP w osoczu następuje głównie na skutek deoksygenacji hemoglobiny oraz wzrostu mechanicznej deformacji krwinek i działających sił ścinających (*shear stress*). Obserwacje pokazujące, że wysiłek prowadzi do wzrostu stężenia nukleotydów adeninowych w płynie śródmiąższowym – z powodu wzrostu pobudzenia współczulnego (ATP wydzielane wraz z NA jako neurotransmitter) lub zwiększonego obrotu ATP w mięśniach sugerują, że ATP w osoczu może potencjalnie pochodzić z innych źródeł niż krwinki czerwone, ale badania przekonują (np. klasyczna praca grupy Prof. Saltina z 2002 r.), że nie stanowią one istotnego źródła ATP w osoczu krwi żyłnej, a uwalnianie ATP z erytrocytów jest jego głównym źródłem.

Biorąc pod uwagę kluczową rolę mechanizmów odpowiadających za zwiększenie transportu tlenu do pracujących mięśni w trakcie wysiłku fizycznego, podjęta tematyka badań przez Doktorantkę jest w mojej ocenie w pełni uzasadniona, a co więcej nowatorska. O ile bowiem, zagadnienia dotyczące mechanizmów uwalniania osoczowego ATP i jego działania są przedmiotem intensywnych badań w ciągu ostatnich lat, to wciąż bardzo mało wiadomo jest na temat jego zmian w wysiłkach ogólnoustrojowych w pełnym zakresie ich intensywności u różnych grup osób. W tym aspekcie, przeprowadzenie przez Doktorantkę eksperymentów z oznaczaniem osoczowego stężenia ATP w grupach wysokiej klasy sportowców o różnej specjalizacji (publikacja 1) i w różnych okresach rocznego programu treningowego (publikacja 2) całkowicie spełnia kryterium oryginalności zrealizowanych w ramach rozprawy doktorskiej badań naukowych. Interesująca z punktu widzenia wartości poznawczych jest także próba powiązania zmian osoczowego stężenia ATP z wiarygodnie zmierzoną wielkością masy mięśniowej badanych osób.

Doktorantka w opublikowanych pracach testowała następujące hipotezy:

1. Wyspecjalizowany trening sportowy (szybkościowo-siłowy, wytrzymałościowy oraz mieszany) determinuje profil zmian osoczowego stężenia ATP podczas wysiłku i restytucji powysiłkowej u wysokowytrenowanych sportowców (publikacja 1),

2. Osoczone stężenie ATP jest uzależnione od masy mięśniowej. Wyższa masa mięśniowa będzie prowadziła do zwiększonego uwalniania ATP w osoczu (publikacja 1),
3. Osoczone stężenie ATP zmienia się w rocznym cyklu treningowym, osiągając najwyższe wartości w okresie startowym (publikacja 2).

W odniesieniu do postawionych hipotez badawczych, Doktorantka w prawidłowy sposób zaplanowała przebieg eksperymentu, począwszy od zebrania odpowiednich grup badawczych, a skończywszy na analizie i interpretacji otrzymanych rezultatów. Jedyną kwestią, która budzi w tym aspekcie moje wątpliwości jest możliwość w pełni przekonującego uzasadnienia hipotezy nr 2, ponieważ tą hipotezę Doktorantka weryfikowała na podstawie zależności korelacyjnej pomiędzy osoczym stężeniem ATP, a masą mięśniową badanych osób. Po pierwsze zatem, występowanie istotnej statystycznie zależności korelacyjnej, oznaczające silną zależność pomiędzy badanymi zmiennymi, nie koniecznie oznacza związek przyczynowy. Po drugie, i to wydaje się bardziej istotne, brakuje w mojej opinii wiarygodnych danych literaturowych, potwierdzających bez wątpliwości, że istotnym źródłem osoczonego stężenia ATP są mięśnie szkieletowe. Na tym etapie, wiadomym jest, że podstawowym źródłem osoczonego stężenia ATP są erytrocyty oraz śródbłonek naczyniowy, natomiast częściowo pochodzenie mięśniowe może mieć stężenie ATP w płynie śródmiąższowym.

Metody badawcze

Doktorantka w przypadku obu publikacji zastosowała wymagające i zaawansowane metody badawcze. Na początku trzeba tutaj podkreślić ogrom wykonanej pracy, której wymagają badania, w których dokonywany jest pomiar konsumpcji tlenu z pobieraniem próbek krwi w trakcie wysiłkowych prób stopniowanych do odmowy w tak znacznej, jak na charakter eksperymentów, grupie badawczej ($n=44$). Ponadto, taki pomiar w przypadku publikacji nr 2 powtórzony został w ciągu rocznego cyklu treningowego aż czterokrotnie. Na uznanie zasługuje również fakt wykorzystania wiarygodnych technik laboratoryjnych, takich jak pomiar konsumpcji tlenu metodą "z oddechu na oddech" (*breath-by-breath*), wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) do oznaczenia osoczowych stężeń nukleotydów czy metody dwuenergetycznej absorbcjometrii rentgenowskiej (DXA) do oceny składu ciała.

Jedynie wątpliwości dotyczące tego aspektu rozprawy doktorskiej budzi fakt sposobu oznaczania punktu kompensacji oddechowej (RCP) oraz zastosowanie jednoczynnikowej analizy wariancji w przypadku większości porównań, zarówno w pierwszej, jak i drugiej publikacji. Jeśli chodzi o oznaczanie RCP, to pierwsza nieścisłość pojawia się w mojej opinii, przy opisie jego metodyki (autoreferat i publikacja 1), gdzie mowa jest o metodzie *V-slope*. W pracy Beaver'a i wsp., do której odnosi się Doktorantka, oznaczenie określone jako *V-slope* dotyczyło punktu zmiany (załamania) w zależności VO_2 i VCO_2 i określania tzw. progu beztlenowego (*anaerobic threshold* - AT), podczas gdy punkt kompensacji oddechowej (RCP - *respiratory compensation point*) był tu określany głównie na podstawie wzrostu V_E do

VCO₂ i występował on wyraźnie później niż AT. Opis wyznaczania RCP w przypadku publikacji nr 2 jest już właściwy, więc wykazaną wyżej nieścisłość odbieram jako nieszczęśliwe przeoczenie. Niemniej jednak, moją wątpliwość niezależnie od tego prawdopodobnego przeoczenia, budzi fakt zastosowania w eksperymentach Doktorantki wyraźnie innego pod kątem dozowania obciążenia protokołu wysiłkowego, od tego zastosowanego w pracy Beaver i wsp. (wzrost tempa przesuwu taśmy o 2 km/h co 3 min w zasadniczej fazie testu *vs.* przyrost mocy na cykloergometrze o 15 W co 1 min). W związku z powyższym, chętnie usłyszałbym uzasadnienie dla zastosowanego protokołu wysiłkowego w kontekście zamiaru wyznaczania punktu kompensacji oddechowej wg metody przedstawionej przez Beaver i wsp. oraz zinterpretowanie zjawiska osiągnięcia RCP na bardzo wysokich procentowych wielkościach maksymalnego minutowego poboru tlenu (szczególnie u nietreningujących, ponieważ osiągnięcie RCP na poziomie 94% VO₂max jest w mojej opinii mocno dyskusyjne).

Strona | 4

Jeśli chodzi natomiast o zastrzeżenia dotyczące analizy statystycznej, to w pierwszej publikacji jednoczynnikowa analiza wariancji z powtarzanymi pomiarami wskazana jest jako metoda analizy zastosowana zarówno do określenia różnic w obrębie jednej grupy badawczej, jak również pomiędzy badanymi grupami. Rozumiem, że w drugim przypadku jest to nieścisłość w opisie analizy, ponieważ metoda ANOVA z powtarzanymi pomiarami stosowana jest w przypadku testowania różnic dla średnich w obrębie tej samej grupy badanych (grupy zależne). Niemniej jednak, w opisywanym modelu eksperymentalnym, określany był zarówno efekt międzygrupowy (różna historia treningowa), jak i wewnątrzgrupowy (powtarzane pomiary w trakcie wysiłku), w związku z czym bardziej odpowiednią metodą analizy wydaje się w mojej opinii przeprowadzenie analizy wariancji w schemacie mieszanym (two-way mixed ANOVA). W przypadku drugiej publikacji natomiast, różnice w zmiennej zależnej (stężenia nukleotydów adeninowych) testowane były z dwoma efektami powtarzanych pomiarów w obrębie jednej grupy badawczej (zmiany w wysiłku oraz zmiany w poszczególnych fazach treningu). W związku z czym wydaje mi się, że w opisie metod statystycznych powinna być mowa o dwuczynnikowej analizie wariancji z powtarzanymi pomiarami. Byłbym ciekawy opinii Doktorantki w tym temacie, jak również ewentualnej weryfikacji uzyskanych wyników przeanalizowanych w ten sposób. Drobnym brakiem jest także nie podanie w opisie metod statystycznych informacji o spełnieniu założeń dla analizy wariancji, które są niezbędnym warunkiem dla jej przeprowadzenia.

Oryginalne osiągnięcia badawcze

Doktorantka na bazie dwóch publikacji przedstawiła wiele interesujących wyników, a szczególnie wartościowym elementem zrealizowanego projektu badawczego było wyselekcjonowanie grup badawczych, w których poza grupą kontrolną, aktywną fizycznie, ale nietreningującą, znaleźli się zawodnicy na wysokim poziomie sportowym, będący reprezentantami kadry narodowej oraz rywalizujący na poziomie narodowym i międzynarodowym w różnych pod kątem metabolicznym dyscyplinach sportowych. Dzięki

temu w publikacji 1 Doktorantka była w stanie pokazać, że najwyższe stężenie ATP w osoczu zanotowano w momencie uzyskania maksymalnej intensywności wysiłkowej, a długofalowy trening ma wpływ na wielkość odpowiedzi ATP w osoczu, ponieważ u osób trenujących wyczynowo wzrost stężenia był istotnie wyższy niż u osób aktywnych fizycznie (~61% vs. ~31%). Ponadto, Doktorantka wykazała, że specyfika treningu sportowego wpływa na profil zmian stężenia ATP w osoczu, ponieważ najwyższe jego wielkości obserwowano u sprinterów, a najniższe u zawodników konkurencji wytrzymałościowych. Taka sytuacja wytłumaczona została koniecznością adaptacji naczyń krwionośnych u sprinterów do szybkiej i wzmożonej wazodylatacji, ze względu na częste podejmowanie wysiłków o wysokiej intensywności i krótkim czasie trwania. Ponadto, zaobserwowanie istotnej dodatniej korelacji pomiędzy spoczynkowym i maksymalnym stężeniem ATP w osoczu z masą mięśni szkieletowych, skłoniło Doktorantkę do konkluzji, że różnice w osoczymym stężeniu ATP między grupami sportowymi w spoczynku oraz podczas maksymalnego wysiłku są przynajmniej częściowo związane z masą mięśni szkieletowych.

W publikacji 2 jednym z głównych uzyskanych wyników było zaprezentowanie, że stężenie ATP w osoczu wzrasta znacząco w kolejnych okresach rocznego cyklu treningowego u wysokowytrenowanych zawodników w trakcie wysiłku oraz restytucji powysiłkowej. Podczas wysiłku we wszystkich badanych grupach sportowych wystąpił średni wzrost osocznego stężenia ATP o 62% w okresie przejściowym i o 103% w okresie startowym. Największy wzrost zaobserwowano u sprinterów (odpowiednio 60% i 114%), a najmniejszy u zawodników wytrzymałościowych (odpowiednio 64% i 95%). W przeciwieństwie natomiast do grup zawodników, stężenie ATP w osoczu w grupie kontrolnej pozostawało na niezmiennym poziomie we wszystkich terminach badań. Stwierdzono także, że gwałtowny wzrost osocznego stężenia ATP towarzyszy osiągnięciu punktu kompensacji oddechowej, co wg Doktorantki odzwierciedlać może częściową niezdolność do dostarczania tlenu do mięśni podczas wysiłku.

Streszczone powyżej główne wyniki i konkluzje pracy Doktorantki mają niekwestionowaną wartość poznawczą i aplikacyjną, a sama ich publikacja w dwóch renomowanych czasopismach naukowych najlepiej świadczy o wysokim poziomie rozprawy doktorskiej. Doceniając te fakty, chciałbym jednocześnie zwrócić uwagę na wątpliwości dotyczące ciekawej, aczkolwiek w mojej opinii dyskusyjnej linii interpretacji dwóch uzyskanych wyników pracy. Pierwsza z nich dotyczy wspomnianego wcześniej sposobu wyznaczania punktu kompensacji oddechowej (RCP), którego osiągnięcie Doktorantka wiązała z częściowym ograniczeniem dostarczania tlenu do pracujących mięśni i większymi przyrostami osocznego stężenia ATP. Druga natomiast związana jest (i tą opiszę w tym miejscu dokładniej) z wnioskowaniem o istotnej roli masy mięśniowej dla większego wzrostu osocznego stężenia ATP we krwi żyłnej ze względu na zaobserwowanie istotnej dodatniej korelacji między masą mięśni szkieletowych i osoczymym stężeniem ATP oraz częściowemu zanikowi różnic we wzroście stężenia ATP w przypadku przeliczeniu go na kilogram masy mięśniowej. Aczkolwiek takie wnioskowanie wydaje się merytorycznie uzasadnione, w mojej

opinii powinno być ono rozpatrywane w kategorii hipotezy, ponieważ w literaturze brakuje danych pokazujących klarownie, że wzrost osocznego stężenia ATP we krwi żyłnej jest pochodzenia mięśniowego. Ponadto, Doktorantka powołuje się na prace Hellsten i wsp. (1998) oraz Mortensena i Saltina (2014) pisząc: "Jednym z potencjalnych źródeł ATP w osoczu mogą być mięśnie szkieletowe (Hellsten i wsp. 1998; Mortensen i Saltin 2014)" (Autoreferat str. 10), podczas gdy w obu tych pracach mowa jest w tym kontekście o stężeniu ATP w płynie śródmiąższowym (*interstitial concentration of ATP*). Wobec tego przytaczanie ich w kontekście stwierdzenia, że mięśnie mogą być źródłem osocznego ATP uznaję co najmniej za niewłaściwie użyty skrót myślowy w autoreferacie, zwłaszcza w obliczu przeważających opinii o tym, że zasadniczym źródłem osocznego ATP są erytrocyty i śródbłonek naczyń. Co ciekawe, w samej publikacji 1, obie te cytacje pojawiają się już we właściwym kontekście. Niemniej jednak, do przedstawionej w autoreferacie i publikacji 1 interpretacji, że wzrost osocznego ATP związany jest przyczynowo z wielkością masy mięśniowej podchodziłbym z ostrożnością. Ponadto, sugerując takie powiązanie, oczekiwałbym także odniesienia się w pracy do możliwych jego mechanizmów transportu pomiędzy naczyniami, płynem śródmiąższowym i komórkami mięśniowymi, podczas gdy o takich informacjach w pracy nie ma nawet wzmianki. Byłbym także ciekawy, czy Doktorantka brała pod uwagę inne możliwe wyjaśnienia zaobserwowanej zależności pomiędzy większą masą mięśniową i wyższymi wysiłkowymi stężeniami osocznego ATP.

Wniosek końcowy

Podsumowując, rozprawa doktorska Pani Mgr Ewy Zarębskiej pt.: "Zmiany osocznego stężenia adenozyntrifosforanu u zawodników klasy mistrzowskiej w rocznym cyklu treningowym", pomimo wskazanych wyżej uwag krytycznych, jest bardzo wartościowym osiągnięciem naukowym wypełniającym kryterium oryginalności w rozwiązaniu ważnego i aktualnego zagadnienia badawczego, spełniając tym samym warunki stawiane pracom doktorskim określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 r., poz. 1668). W oparciu o powyższą opinię wnoszę do Rady Wydziału Nauk o Kulturze Fizycznej, Akademii Wychowania Fizycznego im. Eugeniusza Piaseckiego w Poznaniu, o dopuszczenie mgr Ewy Zarębskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, biorąc pod uwagę bardzo dobry poziom merytoryczny rozprawy oraz publikacje jej wyników w renomowanych czasopismach naukowych z wysokim IF, wnoszę o jej wyróżnienie.

