

Białystok 14. 06. 2018

### Opinia

O rozprawie doktorskiej mgr Damiana Józefa Flisa pt.: „ Wpływ wysiłku pływackiego na stężenie mitochondrialnego cholesterolu oraz metabolizm energetyczny w warunkach stresu oksydacyjnego”.

Podstawą ocenianej rozprawy doktorskiej są trzy publikacje, a mianowicie:

1. Ziółkowski W., Flis D.J., Halon M., Vadhana D.M., Olek R.A., Carloni M., Antosiewicz J., Kaczor J.J., Gabbiannelli R.: Prolonged swimming promotes cellular oxidative stress and p66Shc phosphorylation, but does not induce oxidative stress in mitochondria in the rat heart. *Free Rad Res* 2015, 49, 7-16. Punktacja: IF 2,949; MNiSW 25.
2. Flis D.J., Olek R.A., Kaczor J.J., Rodziewicz E., Halon M., Antosiewicz J., Woźniak M., Gabianelli R., Ziółkowski W.: Exercise-induced changes in caveolin-1, depletion of mitochondrial cholesterol, and the inhibition of mitochondrial swelling in rat skeletal muscle but not in the liver. *Oxid Med Cell Long* 2016, ID. 3620929. Punktacja: IF 4,593; MNiSW 30.
3. Flis D.J., Dzik K., Kaczor J.J., Halon-Golabek M., Wieckowski M., R., Antosiewicz J., Ziolkowski W. Swim training modulates skeletal muscle energy metabolism, oxidative stress and the mitochondrial cholesterol content in Amyotrophic Lateral Sclerosis Mice. *Oxid Med. Cell Long* 2018, ID. 5940748. Punktacja: IF 4, 593; MNiSW 30.

Dwie z tych prac powstały we współpracy z ośrodkiem naukowym we Włoszech zaś jedna we współpracy z ośrodkiem naukowym w Polsce.

Celem pierwszej pracy cyklu (*Prolonged swimming promotes cellular...*) było zbadanie wpływu długotrwałego wysiłku na aktywność białka p66Shc oraz indukcję stresu oksydacyjnego we frakcji komórkowej i mitochondrialnej serca szczura. Zastosowano trzygodzinny test pływania z obciążeniem. Uprzednio szczury „oswajano” przez cztery dni z testem pływania, co niewątpliwie minimalizowało czynnik stresu. Stwierdzono, że zastosowany wysiłek zwiększył w homogenatach mięśnia sercowego stężenie badanych markerów stresu oksydacyjnego a mianowicie stopnia uszkodzenia DNA, oraz poziom grup karbonylowych białek a także dienów. Poziom dienów odzwierciedla stopień peroksydacji lipidów. Zmian takich nie obserwowano w mitochondriach. Produkcja nadtlenu wodoru przez mitochondria również nie uległa zmianie. Wysiłek zwiększył fosforylację białka p66Shc i nie wpłynął na poziom fosforylacji kinaz AKT oraz ERK ½. Poziom białka tych kinaz również nie uległ zmianie. Wysiłek nie wpłynął na aktywność dysmutazy nadtlenkowej oraz katalazy. Również poziom białek pro-apoptycznych Bax i Bcl2 nie uległ zmianie. To zaskakująca obserwacja gdyż składniki te aktywowane są przez białko p66Shc, którego aktywność wzrosła w wyniku wysiłku. Jest to bardzo ważny wynik tej pracy. Wskazuje on jednoznacznie, że w mięśniu sercowym aktywacja białka p66Shc w czasie wysiłku nie prowadzi do aktywacji stresu oksydacyjnego ani też nie zwiększa degradacji ferrytyny H. Zwiększa natomiast poziom ferrytyny L oraz stosunek poziomu ferrytyny L do poziomu ferrytyny H.

Tematyka publikacji nr 2 (*„ Exercise-induced changes in Caveolin-1....”*) jest kontynuacją tematyki pracy poprzedniej. Jej celem jest zbadanie wpływu długotrwałego wysiłku na metabolizm cholesterolu w mitochondriach, stymulowany obrzęk tych organelli, poziom kaweoliny-1 oraz stres oksydacyjny w mięśniu czworogłowym uda oraz w wątrobie. Zastosowano metodę obciążenia wysiłkowego jak w pracy nr 1, co umożliwia stworzenie obrazu całościowego zmian. Uzyskano szereg bardzo interesujących danych. Stwierdzono, mianowicie, spadek poziomu cholesterolu w mięśniu po wysiłku oraz brak zmian w wątrobie. Obrzęk izolowanych mitochondriów stymulowano przy pomocy chlorku wapnia. Zaobserwowano zmniejszenie tego obrzęku w mitochondriach izolowanych z mięśnia czworogłowego natomiast zmiany takiej nie obserwowano w mitochondriach izolowanych z wątroby. Wysiłek zwiększył poziom kaweoliny-1 w mitochondriach mięśniowych i nie wpłynął na poziom tego białka w mitochondriach wątrobowych. Stwierdzono odwrotną zależność pomiędzy poziomem kaweoliny-1 a poziomem cholesterolu w mięśniu po wysiłku.

Wskazuje to na udział kaweoliny-1 w wysiłkowej redukcji zawartości cholesterolu w mięśniach. To bardzo ważna obserwacja, która wskazuje na rolę kaweoliny-1- w regulacji metabolizmu cholesterolu w mitochondriach. Podwyższeniu zawartości cholesterolu w mitochondriach towarzyszy zmniejszenie obrony antyoksydacyjnej oraz natężenia procesów utleniania. Pozwala to sądzić, że powysiłkowe obniżenie poziomu cholesterolu w mitochondriach mięśniowych sprzyja procesom odwrotnym. Dalsze badanie wykazało, że wysiłek wywołał stres oksydacyjny, mierzony poziomem dienów i grup karbonylowych, jedynie w mitochondriach wątroby i nie spowodował tego efektu w mitochondriach mięśniowych. W publikacji tej przedstawiono schematycznie, w oparciu o uzyskane wyniki, własną hipotezę łańcucha przyczynowo-skutkowego obserwowanych zmian.

Trzecia publikacja cyklu („Swim training modulates skeletal muscle...”) dotyczy wpływu treningu na przedstawione niżej parametry w mięśniu szkieletowym myszy ze stwardnieniem zanikowym bocznym. Jest to postępujące schorzenie neurodegeneracyjne, któremu towarzyszy zanik mięśni. Badania przeprowadzono na grupie myszy transgenicznym oraz grupie myszy kontrolnych. Trening trwał od 70 do 115 dnia życia. Praca jest bardzo bogata metodycznie. Oceniano kliniczny obraz postępu schorzenia oraz czas przeżycia. Trening zmniejszył nasilenie objawów schorzenia i wydłużył czas przeżycia. Trening zmniejszył akumulację cholesterolu zarówno w mitochondriach jak też w homogenatach mięśnia u myszy ze schorzeniem. U myszy tych, wystąpił dramatyczny spadek poziomu kaweoliny-1 w mitochondriach, z tym, że trening złagodził wielkość tego spadku. Schorzenie spowodowało spadek o około 70% zdolności oddechowej mitochondriów u myszy nietrenowanych a trening znacznie zmniejszył wielkość tego spadku. Trening zmniejszył też nieco spadek aktywności dehydrogenazy mleczanowej i kinazy kreatynowej w mięśniu. Zmniejszył przyrost poziomu dienów oraz aktywności katalazy a także spadek poziomu grup tiolowych. Dokonano analizy proteomicznej białek mitochondrialnego kompleksu oddechowego oraz kompleksu syntetazy ATP. W pracy zamieszczono obszerną, merytoryczną dyskusję. Sformułowano też hipotezę łańcucha protekcyjnych zmian wywoływanych przez trening u myszy ze stwardnieniem zanikowym bocznym.

Podsumowanie

Rozprawa doktorska mgr Damiana Józefa Flisa spełnia wszystkie warunki obowiązującej Ustawy. Prace wchodzące w skład cyklu opublikowano w znanych czasopismach międzynarodowych. Ich łączny IF wynosi 12,135 zaś liczba punktów MNiSW 85. Dane te wskazują na ich wysoką wartość naukową. Potwierdza to lektura tekstów tych publikacji. Doktorant jest pierwszym autorem dwóch i drugim autorem jednej pracy co świadczy najlepiej o Jego wkładzie w powstanie tego dorobku. Potwierdzają to również załączone oświadczenia współautorów. Omówienie rozprawy zamieszczono na 28 stronach. Tekst omówienia jest klarowny i wyczerpujący. Skazuje to na znajomość badanej problematyki oraz zastosowanych metod badawczych przez Autora. Na podkreślenie zasługuje kompleksowość zastosowanych metodyk w poszczególnych publikacjach. Problematyka badawcza prac jest zwarta. Ich łączącym celem jest zbadanie wpływu wysiłku pływakiego na metabolizm cholesterolu we frakcji komórkowej i mitochondrialnej, czynności mitochondriów oraz stężenie markerów uszkodzenia makromolekuł. Badania przeprowadzono zarówno na zdrowych szczurach jak też myszach transgenicznym z modelem stwardnienia zanikowego bocznego. Wskazuje to na umiejętność Doktoranta uwzględnienia nie tylko warunków zdrowia, lecz również patologii. Podnosi to, niewątpliwie, wartość dysertacji oraz wskazuje na rozległą wiedzę Doktoranta w zakresie mięśni. Wyniki badań będące podstawą Rozprawy jednoznacznie wskazują jak głębokie zmiany w mięśniu sercowym oraz w mięśniach szkieletowych wywiera aktywność skurczowa. Badacze fizjologii i biochemii wysiłku a także czytelnicy publikacji dotyczących wysiłku mięśniowego kierują swoje wysiłki i uwagę głównie w kierunku mechanizmów skurczu, metabolizmu substratów energetycznych, produkcji ATP, równowagi humoralnej i transportu tlenu. Opisane w Rozprawie zmiany metabolizmu cholesterolu i poziomu kaweoliny-1 w mitochondriach zdają się być odległe od tych zagadnień. Ale na pewno nie są produktem ubocznym wysiłku. Jest to aktualnie rozpoznawane zagadnienie, które wskazuje na rozleglejszą ingerencję wysiłku mięśniowego w czynność komórki niż sądzono dotychczas. Wyniki przedstawione w Rozprawie znacząco przyczyniają się do poznania tego zagadnienia. Oferują też kierunki dalszych badań, np. nad mechanizmem pośredniczącym pomiędzy aktywnością skurczową a opisanymi zmianami.

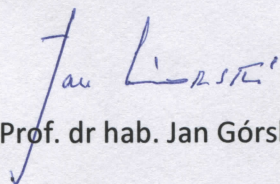
Uważam, że rozprawa doktorska mgr Damiana Józefa Flisa spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawie na stopień doktora nauk o zdrowiu. Mam zaszczyt przedstawić Wysokiej

Radzie Wydziału Nauk o Zdrowiu z Oddziałem Pielęgniarstwa i Instytutem Medycyny Morskiej i Tropikalnej Uniwersytetu Medycznego w Gdańsku wniosek o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wnoszę też o wyróżnienie pracy. Uzasadnienie tego wniosku zawiera się w treści powyższej recenzji.

Najważniejsze przesłanki skłaniające do tego wniosku to:

1. Bardzo wysoki poziom naukowy publikacji
2. Starannie przygotowane omówienia rozprawy
3. Bogata gama zastosowanych metodyk badawczych
4. Poszerzenie wiedzy na temat wpływu wysiłku na metabolizm cholesterolu w mitochondriach mięśniowych nie tylko zwierząt zdrowych, lecz również zwierząt ze stwardnieniem zanikowym bocznym.
5. Zwrócenie uwagi na zagadnienia z zakresu biochemii wysiłku, które były dotychczas poza głównym nurtem badań w tej dziedzinie.



Prof. dr hab. Jan Górski