

RECENZJA PRACY DOKTORSKIEJ

mgr Damiana Józefa Flisa

pt.: „Wpływ wysiłku pływackiego na stężenie mitochondrialnego cholesterolu oraz metabolizm energetyczny w warunkach stresu oksydacyjnego”

Rozprawa doktorska mgr Damiana Józefa Flisa ma charakter eksperymentalny, a tworzy ją cykl trzech publikacji powiązanych ze sobą tematycznie, które ukazały się w recenzowanych czasopismach naukowych. Łączny *impact factor* tych publikacji wynosi 12.135 pkt tj. 85 pkt MNiSW.

Należy dodać, iż poza 3 publikacjami wchodzącymi w skład rozprawy doktorskiej mgr Damian Flis jest współautorem 11 publikacji zamieszczonych w czasopismach z listy filadelfijskiej, a jego wskaźnik Hirscha (według Web of Science) wynosi 5.

Uwagi ogólne

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska mgr Damiana J. Flisa ma typowy układ przewidziany dla cyklu tematycznie powiązanych publikacji, zawiera wprowadzenie, rozdział materiałów i metody, omówienie publikacji wchodzących w skład cyklu wraz z piśmiennictwem (40 pozycji), wnioski oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. Do pracy dołączono kopie omawianych publikacji oraz oświadczenia współautorów publikacji o wyrażeniu zgody na wyodrębnienie części wyników do wyżej wymienionej pracy.

Wkład doktoranta w publikacjach zamieszczonych w cyklu (w dwóch z nich mgr Damian J. Flis jest pierwszym autorem) polegał na udziale w planowaniu eksperymentów, w ich przeprowadzeniu (wysiłek jednorazowy szczurów oraz trening myszy), wykonaniu wybranych oznaczeń (izolacja mitochondriów z tkanki mięśniowej i z wątroby, oznaczenia markerów wolnorodnikowego uszkodzenia białek i tłuszczów, oznaczenia zawartości kaweoliny-1 i cholesterolu w tkance mięśniowej), udziale w przeprowadzeniu oznaczeń aktywności m.in. dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy, udziale w opracowaniu i interpretacji wyników oraz w opracowaniu manuskryptów do publikacji.

Cykl tematycznie powiązanych publikacji przedstawionych do oceny zawiera wyniki dotyczące wpływu jednorazowego, długotrwałego wysiłku pływackiego (przeprowadzonego na szczurach rasy Wistar) jak i treningu pływackiego (przeprowadzonego na transgenicznym mysim modelu stwardnienia zanikowego bocznego, ALS) na stężenie cholesterolu we frakcji komórkowej i mitochondrialnej, stres oksydacyjny oraz funkcję mitochondriów. W hipotezie badawczej mgr Damian J. Flis założył, że zarówno wysiłek jednorazowy jak i trening wpływają na zmianę stężenia cholesterolu w mitochondriach tkanki mięśniowej. Ponadto, w warunkach patologicznych w dystroficznych mięśniach szkieletowych myszy (mysi model stwardnienia zanikowego bocznego) zmianom tym towarzyszy poprawa metabolizmu energetycznego mitochondriów oraz zmniejszenie stresu oksydacyjnego.

Publikacja 1

W pierwszej pracy cyklu pt.: "Prolonged swimming promotes cellular oxidative stress and p66Shc phosphorylation, but does not induce oxidative stress in mitochondria in the rat heart" zamieszczonej w czasopiśmie *Free Radicals Research* w 2015 roku (IF = 2.949 , punktacja MNiSW = 25, liczba cytowań 7), w której mgr Damian J. Flis jest drugim autorem, przedstawiono wyniki badań dotyczące wpływu jednorazowego, długotrwałego wysiłku pływackiego (3 godzinny wysiłek z obciążeniem wynoszącym 3% masy ciała) na fosforylację białka p66Shc i aktywację zależnych od p66Shc szlaków sygnalizacyjnych (Akt i ERK1/2 zależne) jak i markery stresu oksydacyjnego (markery uszkodzenia DNA, grupy karbonylowe, markery peroksydacji lipidów we frakcji komórkowej oraz produkcję nadtlenu wodoru w izolowanych mitochondriach) oraz markery ochrony antyoksydacyjnej (aktywność dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy) w mięśniu sercowym. Na podstawie danych literaturowych wiadomo, że fosforylacja białka p66Shc odgrywa kluczową rolę w aktywacji apoptozy wywołanej zwiększonym stresem oksydacyjnym m.in. wpływając na inaktywację anty-apoptotycznego białka Akt (serynowo-treoninowa kinaza Akt).

W badaniach wykazano, że jednorazowy długotrwały wysiłek fizyczny indukuje stres oksydacyjny we frakcji komórkowej kardiomiocytów co było odzwierciedlone wzrostem markerów stresu oksydacyjnego (wzrost uszkodzenia DNA, stężenia grup karbonylowych i dienów). Ponadto, wysiłek ten aktywuje (wzrost zawartości formy ufosforylowanej) białko p66Shc, ale nie wywiera wpływu na aktywność (tj. ufosforylowanie) białek Akt i ERK 1/2. Pomimo wysiłkowego wzrostu ufosforylowanej formy p66Shc nie obserwowano zmian w zawartości podjednostki H ferrytyny. Wzrost stresu oksydacyjnego we frakcji komórkowej kardiomiocytów nie był związany ze zwiększonym stresem oksydacyjnym we frakcji mitochondrialnej kardiomiocytów – tzn. nie obserwowano zwiększonej produkcji nadtlenu wodoru w mitochondriach izolowanych z kardiomiocytów. Ponadto, wysiłek ten nie wpłynął na zmianę aktywności enzymów ochrony antyoksydacyjnej tj. dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy. Dane te wskazują, że źródłem stresu oksydacyjnego w czasie długotrwałego wysiłku nie są

mitochondria (brak zmian w produkcji H_2O_2 w izolowanych mitochondriach), lecz pozamitochondrialne źródła prawdopodobnie oksydaza ksantynowa czy np. pozamitochondrialne NAP(P)H oksydazy.

Zatem podsumowując, pomimo wysiłkowej aktywacji białka p66Shc nie doszło do wzrostu stresu oksydacyjnego w mitochondriach kardiomiocytów, ani do aktywacji kinaz Akt i ERK. Ponadto, jednorazowy, długotrwały wysiłek fizyczny wpływa na zwiększenie stresu oksydacyjnego we frakcji komórkowej kardiomiocytów przy braku zmian mitochondrialnych wskaźników stresu oksydacyjnego (H_2O_2). Świadczy to o tym, że aktywacja białka p66Shc uznawanego za regulator stresu oksydacyjnego w mitochondriach nie zawsze prowadzi do wzrostu stresu oksydacyjnego.

Publikacja 2

W publikacji pt.: "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" opublikowanej w *Oxid Med Cell Longev.* w 2016 roku (IF = 4.593 , punktacja MNiSW = 30, liczba cytowań 2), przedstawiono wyniki badań dotyczące wpływu jednorazowego, długotrwałego (3 godzinny wysiłek z obciążeniem wynoszącym 3% masy ciała) wysiłku pływackiego na markery stresu oksydacyjnego, stężenie cholesterolu oraz zawartość białka kaweoliny-1 w mitochondriach izolowanych z mięśni szkieletowych oraz z wątroby szczurów.

Badania przedstawione w wyżej przytoczonej pracy (publikacja 2), były kontynuacją badań (Ziółkowski i wsp. 2013) dotyczących wpływu jednorazowego, długotrwałego wysiłku fizycznego na stres oksydacyjny, stężenie cholesterolu i zmiany w oporności mitochondriów izolowanych z mięśnia sercowego. W publikacji autorstwa Ziółkowski i wsp. „Exercise-induced heart mitochondrial cholesterol depletion influences the inhibition of mitochondrial swelling” (*Exp Physiol.* 2013; 98(10):1457-1468, publikacja spoza cyklu), w której współautorem był mgr Damian J. Flis, wykazano, że wywołane wysiłkiem obniżenie stężenia cholesterolu we frakcji mitochondrialnej kardiomiocytów wywołuje protekcyjne zmiany w mitochondriach tj. zmniejsza możliwości otwierania mitochondrialnego megakanatu (mPTP). Jak wiadomo, długotrwałe otwarcie mPTP wpływa na pęcznienie mitochondriów, rozprzęgnięcie procesu fosforylacji oksydacyjnej, ucieczkę cytochromu c co w konsekwencji powoduje śmierć komórki.

Celem badań zamieszczonych w publikacji autorstwa Flis i wsp. 2016 (publikacja 2) było wyjaśnienie znaczenia białka regulującego transport cholesterolu tj. kaweoliny-1 w stwierdzonym uprzednio (Ziółkowski i wsp. *Exp Physiol.* 2013; 98(10):1457-1468) wysiłkowym obniżeniu stężenia cholesterolu. W badaniach zastosowano ten sam model wysiłkowy (3 godzinny wysiłek z obciążeniem wynoszącym 3% masy ciała) i zbadano wpływ zastosowanego wysiłku na stres oksydacyjny, stężenie cholesterolu, zawartość kaweoliny-1 nie tylko w tkance kurczliwej (m. czworogłowy uda), lecz również w tkance niekurczliwej (wątroba) w relacji do oporności mitochondriów na pęcznienie.

Z danych literaturowych wynika, że stężenie mitochondrialnego cholesterolu jest istotne dla prawidłowego funkcjonowania fosforylacji oksydacyjnej, gdyż zarówno zbyt wysokie jak i zbyt niskie stężenie cholesterolu w mitochondriach wpływa na obniżenie efektywności tego procesu (Martin i wsp. 2014, pozycja 28 w spisie literatury). Z kolei, znaczenie kaweoliny-1 w regulacji stężenia mitochondrialnego cholesterolu i w związku z tym sprawności procesu fosforylacji oksydacyjnej zostało potwierdzone na mysim modelu z nokautem tego genu (Bosch et al. 2011, pozycja 15 w spisie literatury).

W pracy (publikacja 2) Flis i wsp. (2016) wykazano, że jednorazowy długotrwały wysiłek spowodował zwiększenie zawartości kaweoliny-1 w mitochondriach, czemu towarzyszyło zmniejszenie stężenia cholesterolu oraz wzrost oporność mitochondriów na pęcznienie indukowane chlorkiem wapnia. Zmiany te występowały jednakże jedynie w mięśniach szkieletowych, natomiast nie występowały w mitochondriach izolowanych z wątroby. Co ciekawe zastosowany wysiłek fizyczny prowadził do zwiększenia poziomu markerów peroksydacji białek i lipidów jedynie w mitochondriach wątroby, pozostając bez wpływu na wielkość stresu oksydacyjnego w mitochondriach mięśni szkieletowych.

Wyniki te uzupełniają dane opublikowane w pracy Ziótkowski i wsp., (*Exp. Physiol*, 2013), gdyż wskazują, że obniżenie stężenia cholesterolu w wyniku jednorazowego, długotrwałego wysiłku jest tkankowo-specyficzne, tzn. występuje w mitochondriach tkanki mięśniowej poprzecznie prążkowanej serca i mięśni szkieletowych, natomiast nie występuje w mitochondriach wątroby. Powysiłkowe obniżenie stężenia cholesterolu, które ma wpływ na wzrost oporności mitochondriów, jest ujemnie skorelowane z zawartością kaweoliny-1 w mięśniach szkieletowych, co przemawia za udziałem kaweoliny-1 w wysiłkowej regulacji stężenia cholesterolu.

Publikacja 3

Celem badań zamieszczonych w trzeciej publikacji wchodzącej w skład cyklu pt.: „Swim Training Modulates Skeletal Muscle Energy Metabolism, Oxidative Stress, and Mitochondrial Cholesterol Content in Amyotrophic Lateral Sclerosis Mice” (*Oxid Med Cell Longev*. 2018; IF=4.593 , **punktacja MNISW = 30**), było zbadanie wpływu progresji choroby (stwardnienia zanikowego bocznego, ALS) jak i wpływu kilku-tygodniowego treningu pływackiego na stężenie cholesterolu, markery stresu oksydacyjnego oraz metabolizm energetyczny w mięśniach szkieletowych w mysim modelu stwardnienia zanikowego bocznego (myszy transgeniczne, mutacja G93A hmSOD). Stwardnienie zanikowe boczne jest schorzeniem neurodegeneracyjnym, śmiertelnym, a za jedną z jego przyczyn uważa się mutację w obrębie genu SOD1, która prowadzi do wzrostu stresu oksydacyjnego i śmierci neuronów m.in. w korze ruchowej, pniu mózgu i rdzeniu kręgowym.

Zwierzęta doświadczalne w eksperymencie tj. myszy transgeniczne i myszy dzikie podzielono odpowiednio na grupy poddane treningowi i grupy kontrolne. Trening pływacki rozpoczynał się w 10-tygodniu życia myszy (myszy dzikie i myszy transgeniczne) i był przeprowadzany 5 razy w tygodniu przez 30 minut dziennie w wodzie o temperaturze 30°C (przepływ prądu 5l/min) przez 5 tygodni. Po 5 tygodniach częstotliwość treningu została zmniejszona do 3 jednostek treningowych w tygodniu. Trening kończył się w 115 dniu życia (tj. po około 6,5 tygodniach).

Po zakończeniu procedury doświadczalnej od zwierząt z grup eksperymentalnych i kontrolnych pobierano mięśnie szkieletowe ud. W homogenatach mięśni szkieletowych kończyn i w mitochondriach oznaczano markery stresu oksydacyjnego, zawartość kaweoliny-1 i stężenie cholesterolu. Ponadto oznaczano aktywność enzymów zaangażowanych w podstawowe szlaki resyntezy ATP w mięśniach szkieletowych tj.: enzymy łańcucha oddechowego (synteza cytrynianowa i oksydaza cytochromowa), glikolizy beztlenowej (dehydrogenaza mleczanowa), reakcji kinazy kreatynowej (CK) oraz zawartość podjednostek kompleksów łańcucha oddechowego. Sprawność mitochondriów badano z zastosowaniem respirometru wysokiej rozdzielczości (oznaczanie RCR).

W badaniach wykazano, że rozwój choroby związany jest ze wzrostem stresu oksydacyjnego, zmniejszeniem zawartości kaweoliny-1 czemu towarzyszy akumulacja cholesterolu i obniżenie sprawności mitochondriów (spadek RCR). Ponadto choroba prowadzi do spadku aktywności enzymów resyntezy ATP tj. syntazy cytrynianowej, dehydrogenazy mleczanowej i kinazy kreatynowej. Z kolei trening pływacki zmniejszał stres oksydacyjny, obniżał mięśniowe stężenie cholesterolu czemu towarzyszył wzrost zawartości kaweoliny-1 jak i poprawiał sprawność mitochondriów (wzrost RCR). Zmiany te były związane z wydłużeniem życia myszy z ALS. Jak wnioskują autorzy poprawa biogenetyki mitochondriów może mieć związek z po-treningowym wzrostem kaweoliny-1 w mitochondriach i związanym z tym spadkiem stężenia cholesterolu zarówno we frakcji komórkowej jak i mitochondrialnej.

Uwagi szczegółowe

Rozprawa przygotowana jest starannie, jednakże z obowiązku Recenzenta zamieszczam poniżej kilka uwag dotyczących przedłożonej rozprawy doktorskiej.

1. Umieszczenie w tytule rozprawy rodzaju zastosowanego wysiłku tj. wysiłek pływacki jest niepotrzebne. Istotniejsza wydaje się informacja o rodzaju zastosowanego modelu wysiłkowego czyli wysiłku długotrwałego (publikacja 1 i 2) oraz kilkutygodniowego treningu (publikacja 3). Zatem zamiast terminu „wysiłek pływacki” lepiej byłoby użyć sformułowania „wysiłek długotrwały oraz trening”.
2. Brak wpływu jednorazowego, długotrwałego wysiłku fizycznego (3 godzinne pływanie z obciążeniem wynoszącym 3% masy ciała w wodzie o temperaturze 35°C) na produkcję H₂O₂ jak i

na inne markery stresu oksydacyjnego (markery peroksydacji lipidów i białek) w izolowanych mitochondriach serca i mięśni szkieletowych (publikacja 1 i 2) jest zastanawiający w świetle licznych danych o produkcji ROS/RNS w mitochondriach mięśniowych po umiarkowanym i ciężkim wysiłku (np. praca Goncalves i wsp. 2016, J Biol Chem). Być może ma to związek z wysiłkami wykonywanymi przed rozpoczęciem eksperymentu, a mającymi na celu przygotowanie zwierząt do wysiłku właściwego. Przygotowanie to polegało na wykonaniu 4 wysiłków o stopniowo wrastającym obciążeniu w kolejnych dniach poprzedzających właściwy eksperyment tj. pierwszego dnia szczury pływały bez obciążenia (30 minut), drugiego obciążenie wynosiło 1% masy ciała (30 minut wysiłku), trzeciego dnia 2% masy ciała (30 minut wysiłku) oraz czwartego - 3% masy ciała (30 minut wysiłku). W piątym dniu przeprowadzano właściwy eksperyment. Brak zmiany markerów stresu oksydacyjnego w mitochondriach mięśni szkieletowych po wysiłku 3 – godzinnym może świadczyć o wpływie wysiłków poprzedzających (4 dniowy krótki trening) na wzrost mitochondrialnej ochrony antyoksydacyjnej m.in. przez wzrost zawartości UCP3.

3. Wnioskowanie o zmianie gęstości mitochondriów jedynie na podstawie zmian w aktywności syntazy cytrynianowej jest uproszczeniem (publikacja 3).

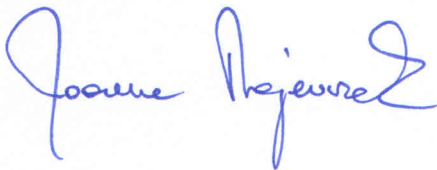
Podsumowanie

Reasumując, rozprawa doktorska mgr Damiana Józefa Flisa pt.: „**Wpływ wysiłku pływackiego na stężenie mitochondrialnego cholesterolu oraz metabolizm energetyczny w warunkach stresu oksydacyjnego**” stanowi próbę rozwiązania ważnego zagadnienia naukowego dotyczącego m.in. wpływu wysiłku fizycznego i wpływu adaptacji treningowej m.in. na zależność między stężeniem cholesterolu w mięśniach a funkcją mitochondriów. Na uwagę zasługuje wprowadzanie do warsztatu naukowego Doktoranta nowoczesnych metod badawczych m.in. LC- MS/MS do analizy białek oraz respirometru wysokiej rozdzielczości do oceny funkcji bioenergetycznej mitochondriów (publikacja 3).

Dorobek naukowy doktoranta oceniam wysoko, gdyż współautorstwo w **14 publikacjach** w czasopismach z listy filadelfijskiej cytowanych łącznie 42 razy oraz **wskaźnik Hirscha wynoszący 5** w naukach o kulturze fizycznej jest rzadkością. Dorobek ten nie byłby możliwy bez współpracy doktoranta z promotorami - dr hab. Wiesławem Ziółkowskim oraz dr hab. Janem Jackiem Kaczorem, którzy są uznanymi badaczami w tematyce bioenergetyki mitochondriów i stresu oksydacyjnego, wywodzącymi się wprost ze słynnej szkoły bioenergetyki wysiłku fizycznego prof. dr hab. Jerzego Popinigisa. Mam nadzieję, że doktorant współpracę tę będzie kontynuował, co zaowocuje w przyszłości powiększeniem dorobku naukowego i dalszym awansem naukowym.

Rozprawa doktorska mgr Damiana Józefa Flisa pt.: „Wpływ wysiłku pływackiego na stężenie mitochondrialnego cholesterolu oraz metabolizm energetyczny w warunkach stresu oksydacyjnego” zarówno w aspekcie merytorycznym jak i redakcyjnym spełnia kryteria i wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim, zgodnie z art. 13 Ustawy „o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki” (Dz.U.2003.65.595 z późniejszymi zmianami). Dlatego wnioskuję do Wysokiej Rady Wydziału Nauk o Zdrowiu, Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Damiana Józefa Flisa do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, mając na uwadze walory poznawcze pracy jak i jej oryginalność wnioskuję o wyróżnienie przedłożonej rozprawy doktorskiej oraz o przyznanie stosownej nagrody leżącej w gestii Dziekana lub Rektora Uczelni.



Dr hab. lek. med. Joanna Majerczak, *prof. nadzw.*

Kraków, 8. 08. 2018 r.