



Prof. dr hab. Barbara Dołęgowska
Katedra Mikrobiologii, Immunologii
i Medycyny Laboratoryjnej
Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie
Al. Powstańców Włkp. 72
70-111 Szczecin
Tel.: 697 909 238
E-mail: barbara.dolegowska@pum.edu.pl

Szczecin, 28.12.2023 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej Mgr Katarzyny Hodun pt.

„Wpływ hipoksji normobarycznej na powysiłkowe zmiany metabolizmu sfingozyno-1-fosforanu we krwi kolarzy”

Promotor: Prof. dr hab. Marcin Baranowski

Praca została zrealizowana w Zakładzie Fizjologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku w ramach kształcenia w Szkole Doktorskiej UMB.

Regularnie podejmowana aktywność fizyczna kształtuje odporność i wydolność organizmu, pomaga w profilaktyce lub opóźnieniu rozwoju wielu chorób. Intensywność ćwiczeń uzależniona jest od stanu zdrowia, wydolności fizycznej i tolerancji wysiłku fizycznego. Podejmowanie aktywności fizycznej angażuje cały organizm, a pozytywne efekty przez nią generowane dotyczą niemal wszystkich narządów i tkanek. Poznanie fizjologii wysiłku fizycznego i towarzyszących mu zmian metabolizmu pozwalają na optymalizację pozytywnych efektów aktywności fizycznej.

W okresie ostatnich kilkunastu lat poczyniono wielkie postępy w poznaniu roli sfingolipidów jako związków biorących udział w wielu istotnych procesach komórkowych, zarówno fizjologicznych jak i patologicznych. Jednym z kluczowych regulatorów tych procesów jest sfingozyno-1-fosforan - cząsteczka o właściwościach plejotropowych, odgrywająca istotną rolę w procesach migracji, adhezji, różnicowania, przeżywalności i czynności wielu komórek, w tym także mięśni szkieletowych. Wewnątrz komórek S1P działa jako przekaźnik drugiego rzędu, indukując między innymi zmiany stężenia jonów

wapniowych, stymulując czynność i biogenezę mitochondriów co przekłada się na ich pojemność oksydacyjną.

Aktywność fizyczna wpływa znacząco na stężenie S1P we krwi i w mięśniach szkieletowych. Hipoksja pobudza z kolei syntezę S1P. Jakich zatem zmian stężenia tego sfingolipidu można się spodziewać podczas treningu przeprowadzonego w warunkach hipoksji? Czy są one korzystne dla organizmu? Czy mogą mieć wpływ na zmiany adaptacyjne organizmu człowieka zachodzące podczas wysiłku fizycznego?

Wobec powyższego aktualność i znaczenie tematu badawczego w pełni uzasadnia podjęcie badań stanowiących zakres rozprawy doktorskiej Pani mgr Katarzyny Hodun. Badania opierały się na wyjściowej hipotezie zakładającej, że wzrost stężenia S1P w odpowiedzi na jednorazowy wysiłek fizyczny jest nasilany przez jednoczesną ekspozycję na niedotlenienie.

Rozprawa została napisana bardzo starannie. W pierwszej części pracy Autorka umieściła swój życiorys naukowy i osiągnięcia, obejmujące publikacje naukowe, których była współautorką, konferencje naukowe, w których aktywnie uczestniczyła, realizowane projekty naukowe, wyjazdy na staże i praktyki, ukończone szkolenia i kursy oraz otrzymane nagrody.

Ocena merytoryczna rozprawy

Rozprawa doktorska Pani mgr Katarzyny Hodun składa się z dwóch spójnych tematycznie publikacji.

Pierwsza z cyklu - publikacja przeglądowa pt: *Sphingosine-1-phosphate in acute exercise and training. Hodun K, Chabowski A, Baranowski M. Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports. 2021; 31: 945-955 (IF 4,645; MeiN 140)* jest wyczerpującą analizą 86 pozycji literatury z okresu od 1992 do 2020 r. Pisząc ją Doktorantka wykorzystwała głównie prace źródłowe, co dowodzi rzetelnej analizy tematyki badawczej. W swojej pracy Doktorantka opisuje sfingozyno-1-fosforan (S1P) jako bioaktywny sfingolipid działający jako wewnątrzkomórkowy drugi przekaźnik lub jako ligand receptorów o różnym rozmieszczeniu tkankowym. Osoczowy sfingozyno-1-fosforan jest transportowany w połączeniu z lipoproteinami o dużej gęstości (HDL) i albuminą. Komórki śródbłónka naczyniowego i erytrocyty są głównymi źródłami krążącego S1P. Płytki krwi uwalniają nagromadzony S1P dopiero po ich aktywacji. Badania przeprowadzone na przestrzeni ostatnich dwóch dekad wskazują na ważną rolę krążącego S1P w fizjologii i patofizjologii. W dojrzałym organizmie S1P reguluje napięcie naczyń, utrzymuje integralność śródbłónka, procesy przebudowy tkanki sercowej, reguluje kurczliwość serca, w osoczu reguluje transport komórek odpornościowych,

homeostazę kości i angiogenezę. Ponadto S1P związany z HDL charakteryzuje się silnym działaniem przeciwmiażdżycowym i kardioprotekcyjnym. W ostatnich latach stwierdzono, że jest on także ważnym regulatorem czynności mięśni szkieletowych, a aktywność fizyczna ma znaczący wpływ na metabolizm oraz zawartość/stężenie tego sfingolipidu w mięśniach i we krwi odgrywając ważną rolę w adaptacji do wysiłku fizycznego.

Przedstawiona praca przeglądowa jest dowodem bardzo dobrego przygotowania Doktorantki do badań nad tezami rozprawy doktorskiej oraz umiejętności krytycznej oceny tekstu naukowego i formułowania wniosków.

W drugiej pracy, oryginalnej pt: *The effect of normobaric hypoxia on acute exercise-induced changes in blood sphingoid base-1-phosphates metabolism in cyclists. Biology of Sport. Data akceptacji do druku: 17.08.2023. Hodun K, Czuba M, Ploszczyca K, Sadowki J, Langfort J, Chabowski A, Baranowski M.* Doktorantka badała wpływ hipoksji normobarycznej na powysiłkowe zmiany stężenia S1P we krwi zawodowych kolarzy. Uczestnicy badań zostali poddani dwóm rodzajom jednorazowego wysiłku: wysiłkowi o wzrastającym obciążeniu, aż do wyczerpania oraz stymulowanej 30-kilometrowej próbie czasowej. Obydwa testy były przeprowadzone w warunkach normoksji i hipoksji normobarycznej. Próbkę krwi były pobierane od sportowców 3-krotnie: przed wysiłkiem, zaraz po jego ukończeniu i po 30-minutowym odpoczynku. Ocenę zawartości S1P, dihydrosfingozyno-1-fosforanu, sfingozyny, dihydrosfingozyny, ceramidu i dihydroceramidu we krwi wykonano metodą ultrasprawną chromatografię ciekłą (UPLC). Metodę chromatografii ciekło-gazowej wykorzystano do oznaczenia zawartości sfingomieliny w erytrocytach i płytkach krwi. Doktorantka na podstawie przeprowadzonych badań stwierdziła, że w wyniku długotrwałego wysiłku o charakterze tlenowym dochodzi do wzrostu stężeń dhS1P w osoczu, zarówno w połączeniu z HDL, jak i z albuminą, co wskazuje na nasiloną produkcję i uwalnianie tego związku przez erytrocyty. Zmiany zawartości dhS1P w poszczególnych frakcjach były niezależne od warunków tlenowych. Pojedynczy wysiłek fizyczny o dużej intensywności przeprowadzony w warunkach normoksji spowodował zwiększenie stężenia osoczowego S1P transportowanego przez HDL. Hipoksja normobaryczna zapobiegła zwiększeniu stężenia S1P w osoczu w następstwie pojedynczego wysiłku fizycznego o charakterze beztlenowym, czego powodem jest zmniejszenie zawartości tego sfingolipidu w erytrocytach.

Doktorantka bardzo szczegółowo i krytycznie dyskutuje w publikacji uzyskane wyniki. Bardzo interesujący jest przebieg eksperymentu nad uwalnianiem S1P i dhS1P do osocza przez wyizolowane erytrocyty.

Mam pytania dotyczące procesu pobierania, zabezpieczania i frakcjonowania pobranych próbek krwi: 1) zgodnie z opisem krew od uczestników badania była pobierana jedynie do probówek z wersenianem (sodowym czy potasowym?) – czy w przypadku badań płytek krwi rozważano pobieranie krwi do probówek z cytrynianem sodu lub heparyną w celu uniknięcia ich agregacji pod wpływem EDTA?; 2) zaraz po pobraniu i wymieszaniu próbkę krwi umieszczano „w lodzie” – czy nie dochodziło do aktywacji płytek, czego konsekwencją mogło być uwalnianie z nich S1P?

Ocena formalna rozprawy

Rozprawa doktorska Pani mgr Katarzyny Hodun jest napisana w postaci komentarza do 2 spójnych tematycznie prac – przeglądowej i oryginalnej. Doktorantka jest pierwszym autorem w obydwu publikacjach. Parametry bibliometryczne prac są bardzo wysokie (sumaryczny IF 10,245; pkt. MEiN 240), co wyróżnia recenzowaną pracę doktorską na tle innych rozpraw z dyscypliny nauk medycznych. Swoj twórczy wkład Doktorantka definiuje jako: opracowanie koncepcji pracy przeglądowej, zebranie piśmiennictwa i jej napisanie (udział: 70%), opracowanie koncepcji badań w pracach oryginalnych, przygotowanie materiału do badań, wykonanie analiz laboratoryjnych, opracowanie wyników, zebranie piśmiennictwa, opracowanie wyników, przygotowanie rycin i napisanie manuskryptu (udział: 60%). Powyższe aktywności są dowodem samodzielności Doktorantki i umiejętności pracy naukowej na każdym jej etapie.

Komentarz do prac został napisany w układzie zbliżonym do klasycznej rozprawy doktorskiej. Rozprawę podzielono na rozdziały, rozpoczynając od „Wstępu”, w którym Doktorantka w ogólnym zarysie pisze o wysiłku fizycznym w warunkach hipoksji i o wpływie zmniejszonego ciśnienia parcjalnego tlenu na organizm człowieka, a także o metabolizmie, transporcie i roli S1P w funkcjonowaniu mięśni szkieletowych i ich adaptacji do wysiłku fizycznego oraz metabolizmie S1P w warunkach hipoksji opisywanych w cytowanym piśmiennictwie. W rozdziale „Cele pracy”. Autorka przedstawia swoje plany badawcze, a w kolejnym „Materiały i metody” szczegółowo opisuje grupę badaną, przebieg eksperymentu i wykonane oznaczenia oraz analizę statystyczną. Rozdział „Wyniki” zawiera szczegółowe omówienie wyników badań znajdujących się w pracy oryginalnej, a rozdział „Wnioski” – 3 wnioski oparte na przedstawionych w pracy wynikach. Rozprawę zamykają streszczenia w języku polskim i angielskim, oświadczenia współautorów prac, kopia uchwały Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku wyrażająca zgodę na

prowadzenie przedstawionego tematu badawczego i piśmiennictwo, zawierające 42 pozycje starannie dobrane merytorycznie.

Kolejne rozdziały to: „Streszczenie w języku polskim”, „Streszczenie w języku angielskim”, „Wykaz skrótów” oraz „Piśmiennictwo”, które zawiera 67 pozycji w większości najnowszych i starannie dobranych merytorycznie. Kolejne rozdziały to „Teksty publikacji” oraz „Oświadczenia współautorów”.

Z obowiązku recenzenta pragnę zwrócić uwagę na pewne drobne błędy edytorskie, które pojawiły się w przedstawionej mi do oceny pracy. Strona 20, wiersz 23: „...*po przeprowadzeniu wysiłku na cykloergometrze...*”? wiersz 26: „...*po przeprowadzeniu symulowanej 30km kolarskiej próby czasowej*”? Strona 22, wiersz 27: „...*krew odwirowano przy przeciążeniu 380xg...w celu separacji osocza i erytrocytów*”? Strona 23, wiersz 3: „...*odwirowane przy obciążeniu 800xg...*”? Strona 25, wiersz 22: „*Stężenie białka w osoczu, albuminach...*” (czy może: stężenie białka całkowitego i albuminy w osoczu?). Strona 25, wiersz 25: „...*próby oznaczono w tryplikacie.*” Powyższe uwagi mają jedynie charakter redakcyjny i w żadnej mierze nie umniejszają bardzo dużej wartości pracy.

Praca doktorska Pani mgr Katarzyny Hodun została zrealizowana w ramach projektu OPUS 16 o numerze 2018/31/B/NZ7/02543, finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki. Stanowi samodzielny dorobek naukowy. Realizacja badań wymagała olbrzymiego nakładu pracy i wielu umiejętności. Praca wnosi nowe, ważne informacje do dotychczasowego stanu wiedzy, otwiera nowe możliwości postępowania badawczego w podjętym przez Doktorantkę temacie.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz.U. z 2023 poz. 742)

Zwracam się do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr Katarzyny Hodun do dalszych etapów przewodu doktorskiego w dziedzinie - nauki medyczne i nauki o zdrowiu, dyscyplinie - nauki medyczne.

Podkreślając wysoki poziom naukowy rozprawy i duży wpływ wyników na rozwój dyscypliny wnioskuję o wyróżnienie rozprawy.

Z wyrazami szacunku,
Barbara Dołęgowska