

dr hab. n. farm. Małgorzata Maciążek-Jurczyk, prof. SUM
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu
Katedra i Zakład Farmacji Fizycznej
41-200 Sosnowiec, Jagiellońska 4
tel. (32) 364 15 80-82
mmaciazek@sum.edu.pl

Katowice, 08.08.2022

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ
pt. „RÓŻNICOWA KALORYMETRIA SKANINGOWA JAKO NOWATORSKA METODA W OCENIE
EFEKTÓW WSPOMAGANIA TRENINGU SIŁOWEGO”

wykonanej przez
mgr inż. Klaudię Duch
w Instytucie Fizyki im. Augusta Chełkowskiego
Wydziału Nauk Ścisłych i Technicznych
Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach

Przewód doktorski realizowany w ramach Studiów Doktoranckich na kierunku Fizyka
Wydziału Nauk Ścisłych i Technicznych
Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach

Promotor: dr hab. Anna Michnik, prof. UŚ

Ocenę rozprawy doktorskiej przygotowano w związku z pismem z dnia 22.06.2022 Dyrektora Instytutu Fizyki im. Augusta Chełkowskiego Wydziału Nauk Ścisłych i Technicznych, dr hab. Sebastiana Pawlusa, prof. UŚ, zgodnie z uchwałą Rady Instytutu Fizyki UŚ z dnia 21.06.2022.

1. OCENA OGÓLNA

Podstawą ubiegania się Pani mgr inż. Klaudii Duch o stopień naukowy doktora nauk fizycznych jest rozprawa doktorska o wspomnianym tytule, którą stanowią odpowiednio zaprezentowane w formie sześciu naukowych prac eksperymentalnych wyniki badań dotyczących zastosowania techniki różnicowej kalorymetrii skaningowej DSC, celem określenia wpływu różnych form wspomagania treningu sportowego na przebieg procesu termicznej denaturacji białek surowicy krwi sportowców. Pani mgr inż. Klaudia Duch jest absolwentką Fizyki Medycznej Wydziału Nauk Ścisłych i Technicznych Uniwersytetu Śląskiego. W 2015 roku uzyskała tytuł inżyniera a w 2016 roku magistra fizyki medycznej. Biorąc pod uwagę powyższe można sądzić, że Pani mgr inż. przystępując do realizacji pracy doktorskiej była merytorycznie przygotowana do podjęcia doktoratu, a prowadzone badania w mojej opinii mogą stanowić uzupełnienie dotychczasowej wiedzy na temat zmian zachodzących w surowicy krwi pod wpływem wysiłku fizycznego.

Każda z prac prezentująca wyniki zespołu badawczego, spośród którego Doktorantka z opieką naukową Promotora pracy, dr hab. Anny Michnik, prof. UŚ, zajmowały się analizą DSC, znajduje się na liście

czasopism JCR (pochodzących z wydawnictw Springer i Elsevier), a ich średnia wartość IF wynosi 3.5725. Rozprawa ma charakter interdyscyplinarny, otóż łączy zagadnienia z dyscyplin nauk fizycznych, chemicznych, biologicznych oraz nauk medycznych, nauk o zdrowiu i kulturze fizycznej (medycyna sportowa i fizjoterapia). Skutki intensywnego wysiłku, regeneracja oraz metody wspomagania treningów w sporcie są niezwykle istotne, a przede wszystkim ważne z punktu widzenia prawidłowego funkcjonowania organizmu. Różnicowa kalorymetria skaningowa DSC wydaje się być przyszłościową techniką w diagnostyce medycznej. Dane literaturowe dostarczają wiele doniesień na temat badań surowicy krwi i innych płynów fizjologicznych celem klinicznego rozpoznania i monitorowania przebiegu chorób i efektów zastosowanej terapii. Dzieje się tak dlatego, ponieważ wrażliwe na zmiany w proteomie osocza profile DSC biopłynów, które świadczą o strukturze molekularnej próbek, mogą odzwierciedlać zmodyfikowaną stabilność termiczną (m.in. z powodu wiązania biomarkerów chorób), co może korelować ze stanem klinicznym badanych osób. Biorąc pod uwagę powyższe, tematyka opisana w pracy i wiedza na ten temat wydają się aktualne i niezbędne, a umiejętność interpretacji widm różnicowej kalorymetrii skaningowej surowicy krwi i ich zmian w związku z działaniem czynników zewnętrznych wskazuje na potencjał wykorzystania wyników w terapiach. Połączenie techniki DSC z nowoczesnymi metodami diagnostycznymi może stanowić kompleksowe narzędzie do analizy próbek biologicznych i diagnostyki pacjentów. Z powyższych względów podjęcie przez Doktorantkę niniejszego tematu badawczego uważam za uzasadnione, ważne z punktu widzenia metodologicznego, poznawczego jak i diagnostycznego, a dysertację oceniam pozytywnie.

2. OCENA MERYTORYCZNA

2.1 Znaczenie problematyki podjętej w recenzowanej rozprawie

Różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC) jest techniką wykorzystywaną do badania stabilności molekuł. Jest bardzo rozpowszechniona w inżynierii białek, projektowaniu leków i produkcji biofarmaceutycznej, czyli tam gdzie uzyskanie najtrwalszego związku jest najważniejsze. Treść pracy nie należy do najłatwiejszych i wymaga ogólnej wiedzy dotyczącej zastosowania kalorymetrii w badaniach surowicy krwi, jej wnikliwa lektura pozwala na wyjaśnienie wielu ważnych z punktu widzenia medycznego kwestii. Wszystkie z uzyskanych wyników badań nad analizą DSC surowicy krwi sportowców zostały zawarte w sześciu pracach wieloautorskich, w dwóch spośród nich Doktorantka była pierwszym autorem, o łącznym współczynniku oddziaływania 21.435 i łącznej punktacji MEiN: 495.

- **A1.** Michnik A, Sadowska-Krępa E, Domaszewski P, **Duch K**, Pokora I. Blood serum DSC analysis of well-trained men response to CrossFit training and green tea extract supplementation. J Therm Anal Calorim. 2017, 130, 1253–1262
- **A2.** **Duch K**, Michnik A, Pokora I, Sadowska-Krępa E, Kiełboń A. Whole-body cryostimulation impact on blood serum thermal denaturation profiles of cross-country skiers. J Therm Anal Calorim. 2019, 138, 4505–4511
- **A3.** Michnik A, Pokora I, **Duch K**, Sadowska-Krępa E. Differential scanning calorimetry reveals that whole-body cryostimulation in cross-country skiers can modify their response to physical effort. J Therm Anal Calorim. 2021, 143, 255–264
- **A4.** **Duch K**, Michnik A, Pokora I, Sadowska-Krępa E. Modification of blood serum DSC profiles by sauna treatments in cross-country skiers during the exercise cycle. J Therm Anal Calorim. 2020, 142, 1927–1932

- **A5.** Michnik A, **Duch K**, Pokora I, Sadowska-Krępa E. Differences in cryostimulation and sauna effects on post-exercise changes in blood serum of athletes. *Complement. Ther. Med.* 2020, 51, 1–6
- **A6.** Michnik A, Sadowska-Krępa E, Kiełboń A, **Duch K**, Bańkowski S. Blood serum denaturation profile examined by differential scanning calorimetry reflects the effort put into ultramarathon by amateur long-distance runners. *J. Therm. Biol.* 2021, 99, 1–7

Istnieje wiele niewyjaśnionych w pełni kwestii, które dotyczą przemian konformacyjnych białek zachodzących pod wpływem czynników fizykochemicznych, zwłaszcza w aspekcie funkcjonowania żywych organizmów. Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska może stanowić element badań rozwojowych wnoszących wkład w poznanie i zrozumienie zjawisk fizycznych, które leżą u podłoża procesów wywołujących określone skutki w danych warunkach środowiskowych.

2.2 Metodyka badawcza

Podstawę recenzowanej rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Klaudii Duch stanowi cykl sześciu wieloautorskich prac eksperymentalnych. Ogólny cel pracy i zaprezentowana metodyka dotyczyły próby zastosowania różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC) do oceny efektów stosowania przez sportowców różnych form wspomagania treningu sportowego. Pani Doktorantka podjęła się trudnej oceny surowicy krwi sportowców, uczestników biorących udział w projekcie pn. „Ocena efektywności oddziaływań cieplnych (ciepła, zimna) stosowanych w odnowie biologicznej u zawodników dyscyplin wytrzymałościowych w rocznym cyklu treningowym” (Nr rej. 0050/RS4/2016/54), kierowanym przez Prof. Ilonę Pokorę, w ramach współpracy z Akademią Wychowania Fizycznego (AWF) im. Jerzego Kukuczki w Katowicach. Biorąc pod uwagę tematykę publikacji, podkreślam udział Pani Doktorantki w opracowaniu metodyki badań DSC pozyskanego i przygotowanego do badań materiału, wykonaniu pomiarów, opracowaniu i analizie danych. Koncepcja badań biochemicznych, rekrutacja uczestników, opracowania metodyki i analizy biochemiczne należały do pozostałych uczestników projektu.

2.3 Struktura rozprawy

Przedstawiona do recenzji praca doktorska została przygotowana zgodnie z wymogami ustawowymi. Liczy 155 stron wraz z załącznikami. Doktorantka w swoim opracowaniu kolejno prezentuje streszczenie w języku polskim i w języku angielskim oraz (i) wprowadzenie, (ii) metodykę badań, (iii) cel pracy, (iv) opis badań własnych – synteza, (v) wykaz artykułów stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej wraz z oświadczeniami współautorów, (vi) podsumowanie, (vii) spis rysunków, (viii) bibliografia. Wydaje się, że wykaz skrótów, którego nie zamieszczono, ułatwiłby czytelnikowi poruszanie się po obszernym wstępie i opracowaniu jak na pracę doktorską realizowaną w formie cyklu publikacji naukowych. Praca powinna zawierać także dorobek naukowy Doktorantki w postaci wykazu publikacji i doniesień zjazdowych, przygotowany przez Dział Bibliografii i Bibliometrii UŚ oraz inne osiągnięcia, co nie wchodziłoby w skład ocenianego opracowania. Brakuje również informacji o finansowaniu badań.

2.4 Wykorzystana literatura

Lista zacytowanych prac została dobrana przez Autorkę rozprawy poprawnie, co stanowi uzupełnienie prezentowanych zagadnień naukowych. Doktorantka dokonała przeglądu literatury z zakresu dotychczasowej wiedzy na badany temat oraz wykorzystała doświadczenie Promotora pracy, dr hab. Anny Michnik, prof. UŚ, autorytetu w dziedzinie mikrokalorymetrycznych analiz białek surowicy krwi.

2.5 Szczegółowa ocena merytoryczna

Przedłożona mi do recenzji dysertacja doktorska przygotowana przez Panią mgr inż. Duch stanowi dowód orientacji Doktorantki w badaniach DSC białek, co jest nie lada wyzwaniem. Mimo pozytywnej oceny, rolą Recenzenta jest także przedstawienie wszystkich uwag i wątpliwości nie tylko natury redakcyjnej, co zebrano poniżej. Niektóre wymagają odniesienia Doktorantki względem nich.

Tytuł

Praca doktorska została zatytułowana: „Różnicowa kalorymetria skaningowa jako nowatorska metoda w ocenie efektów wspomagania treningu sportowego”. Świadoma tego, iż na tym etapie nie ma możliwości modyfikacji treści tematu, niemniej jednak ze względu na pełnioną przeze mnie rolę recenzenta uważam, iż w tym miejscu należy się krótka polemika nad tematem pracy. Nie bardzo zrozumiałym jest fakt oszacowania DSC jako nowatorskiego narzędzia badawczego w pracy, skoro technika ta stosowana jest od lat. Celowo podkreśliłam słowo „technika”, gdyż DSC nie jest przecież metodą. Może w momencie podjęcia się opublikowania rozprawy w formie pracy przeglądowej, oczywiście w cytowanym czasopiśmie, trafnym byłoby zatytułować pracę jako „Technika różnicowej kalorymetrii skaningowej DSC w ocenie efektów wspomagania treningu siłowego”. Studiując tytuł nasuwa się kolejne pytanie nawiązujące tym razem do „oceny efektów wspomagania treningu sportowego”. Bo skoro w każdej z prac omawiany był profil DSC surowicy krwi przed i po treningu, a efektem wspomagania treningu siłowego była ocena surowicy jako jedynego parametru, w mojej ocenie ostateczna wersja tytułu pracy powinna brzmieć: „Technika różnicowej kalorymetrii skaningowej DSC w ocenie zmian zachodzących w surowicy krwi sportowców”.

Streszczenie

Kolejno w pracy pojawia się **Streszczenie** w języku polskim i w języku angielskim. W mojej ocenie powinno się znaleźć na końcu, jako uzupełnienie prac i własnego komentarza Doktorantki. Jego zawartość dowodzi o dojrzałości naukowej i stanowi uzupełnienie charakterystyki prezentowanych zagadnień naukowych. W treści streszczenia pojawia się określenie różnicowej kalorymetrii skaningowej jako metody (str. 5) – DSC nie jest metodą a techniką analizy termicznej wykorzystywaną do badania stabilności molekuł, opartą na metodzie pomiaru zmian cieplnych w trakcie wzrostu bądź spadku temperatury. W tym miejscu także pragnę zwrócić uwagę, iż Autorka wspomina o literaturze nt. zastosowania DSC w medycynie sportowej (str. 5). Dane te, jak sama Doktorantka zauważa, pochodzą sprzed kilkunastu lat, dlatego tym bardziej moja uwaga, by nieco zmodyfikować tytuł dysertacji o nowatorskim zastosowaniu tejże techniki, jest celowa. Autorka pracy wspominała także, że w pracy śledzono cyt. „przebieg procesu termicznej denaturacji białek zawartych w surowicy krwi” (str. 5). Proszę o wyjaśnienie, jakie białka były analizowane?. Pragnę również zwrócić uwagę na kolejną kwestię, pozwalając sobie na przytoczenie pewnej frazy: cyt. „Brak jakichkolwiek statystycznie istotnych różnic pomiędzy uśrednionymi wartościami parametrów przejścia mógł być spowodowany zaobserwowaną dużą zmiennością osobniczą zarówno krzywych DSC surowic, jak i odpowiedzi na wysiłek uczestników tego badania” (str. 5) – czy można mówić o dużej zmienności osobniczej przy tak

stosunkowo małej liczbie badanych sportowców? Analizując streszczenie, nasuwa się kolejne pytanie, które wymaga wyjaśnienia/dyskusji. Cyt. „Zabiegi kriostymulacji całego ciała (WBC) spowodowały zmniejszenie reakcji na ćwiczenia fizyczne i przyspieszyły regenerację po wysiłku. Zabiegi sauny fińskiej wywołały przeciwny efekt, tzn. spowodowały silniejszą reakcję na wysiłek. W przypadku zabiegów sauny fińskiej zaobserwowano spore zróżnicowanie wyników DSC świadczących o cofaniu się zmian powysiłkowych podczas procesu regeneracji po ćwiczeniach” (str. 5) – które parametry świadczą o wspomnianych wyżej efektach? Skąd wiadomo, że zmiany w profilach DSC można odnieść do regeneracji, cofania zmian powysiłkowych itp.?

Wprowadzenie

Kolejny rozdział **Wprowadzenie** dotyczy wiedzy w zakresie proteomu surowicy krwi ludzkiej, głównych frakcji białek surowicy, czy też zmian w proteomie surowicy odzwierciedlających stan zdrowia pacjenta. Doktorantka bardzo szczegółowo scharakteryzowała technikę DSC w badaniach białek i płynów fizjologicznych. Na uwagę zasługuje również, może nieco zbyt szczegółowy, opis treningów w sportach siłowych i wytrzymałościowych. Informacje mają charakter uporządkowany i stanowią o dobrym przygotowaniu merytorycznym Doktorantki z zakresu interdyscyplinarnej wiedzy. Z uwagi na wyczerpujący i obszerny opis nie trudno wystrzec się nieścisłości, które wymagają wyjaśnienia bądź dyskusji. Na str. 7 Autorka pisze, cyt. „Organizm sportowców po sezonie startowym jest przeciążony i bardziej podatny na infekcje. W celu regeneracji organizmu oprócz samego wypoczynku stosowane są zabiegi odnowy biologicznej” – czy zabiegi odnowy biologicznej prócz wiadomej regeneracji zmniejszają ryzyko infekcji? Budzi również zainteresowanie kolejny fragment, cyt. „Jeszcze nie do końca znane są skutki działania na organizm ludzki zabiegów czy suplementów diety” (str. 7). Jak powszechnie wiadomo, leki są objęte przepisami Prawa Farmaceutycznego, a suplementy diety podlegają Głównemu Inspektoratowi Sanitarnemu, dlatego nie będą znane skutki uboczne działania na organizm suplementacji. Jeśli, jak wspomina Pani Magister, nie do końca są znane, czy to oznacza, że są już znane jakieś przypadki? Proszę o literaturę. Doktorantka wspomina, iż cyt. „jednymi z najpopularniejszych suplementów wśród sportowców są: witaminy....” (str. 7) – jakiego rodzaju witaminy? Na str. 7 zostało napisane, iż cyt. „Dostępna, choć obszerna literatura naukowa nie dostarcza jasnej odpowiedzi na wiele pytań” – należałoby doprecyzować, jakich pytań? Z lektury wprowadzenia wynika, że proteom osocza to „białkowy odpowiednik genomu każdego organizmu, czyli kompletna informacja białkowa” (str. 8) – nie można porównywać mieszaniny białek osocza do stałego i charakterystycznego dla organizmu genomu, ale biorąc pod uwagę ogrom informacji, jakie ze sobą niesie, może trafnej byłoby po prostu określić, że „stanowi kompletną informację białkową”. Doktorantka w kolejnym zdaniu pisze, że cyt. „Osocze jest wyjątkowym, najbardziej złożonym proteomem pochodzenia ludzkiego” (str. 8) – wiele innych składników ludzkiego organizmu uważa się za złożoną maszynę, np. maszyneria transkrypcyjnotranslacyjna w komórkach, białka łańcucha oddechowego. Można zatem zaniechać określenia „najbardziej złożonym”. Pani Magister w następnym zdaniu pisze, że cyt. „Proces syntezy białek związany jest głównie z wątrobą, komórkami plazmatycznymi (γ -globuliny), oraz komórkami śródbłonna (zachodzi dzięki polirybosomom)” – czy to oznacza, że m. in. γ -globuliny są odpowiedzialne za syntezę białek? Kolejny akapit dotyczy cyt. „Analizy całościowej proteomu” (str. 8) – czy analiza całościowa, czyli wszystkich białek organizmu, w jednym badaniu jest możliwa? Na str. 10 Pani Doktorantka pisze, iż cyt. „Białka krążące w organizmie zmieniają się wraz z wiekiem, a także w różnych stanach fizjologicznych i patologicznych” – może trafniej byłoby uznać, iż struktura białek/jakość/ilość zmieniają się podczas starzenia organizmu czy w różnych stanach fizjologicznych i patologicznych. Ponadto cyt. „Substancje aktywne zawarte w ziołach/mieszkankach

ziołowych, których dokładny skład nie zawsze jest znany...” (str. 11) – w zasadzie nigdy nie jest znany. Píše Pani także, że cyt. „Wysiłek fizyczny ma istotny wpływ na wyniki badań laboratoryjnych” (str. 12) – jak się Pani odniesie do zafałszowania wyników badań, które zostały/byłyby zlecone i wykonane po treningu? A sugestie dotyczące wykonania badania laboratoryjnego nie wcześniej jak dobę po treningu? Kolejna propozycja to unikanie żargonu laboratoryjnego – m.in. w zdaniu, cyt. „Podczas wysiłku fizycznego dochodzi do przesunięć płynów pomiędzy przestrzenią wewnątrznaczyniową i śródmiąższową (str. 12)” – proszę o odpowiedni zamiennik sformułowania „przesunięcie płynów”. Na tej samej stronie pisze Pani, że cyt. „Duże ilości białek ostrej fazy (BOF) zostają uwolnione do osocza przez szkodliwe czynniki takie jak...” – zdanie brzmi jakby to szkodliwe czynniki uwalniały białka ostrej fazy, a nie organizm – zdanie należy przeredagować – jakie czynniki szkodliwe? W części dotyczącej DSC jest napisane, że cyt. „Metoda ITC jest stosowana do otrzymywania parametrów kinetycznych”... (str. 13) – nie tylko, ponieważ dostarcza także informacji na temat parametrów termodynamicznych. Dodatkowo cyt. „Podczas reakcji, ciepło jest absorbowane bądź uwalniane i taki efekt jest mierzony przez czuły mikrokalorymetr podczas stopniowego miareczkowania ligandu do celi badawczej zawierającej makromolekułę (str. 13)” – nie zawsze, można także miareczkować makromolekułę (ponadto proszę używać sformułowania „liganda”). W części dotyczącej DSC białek Doktorantka pisze, iż cyt. „Denaturacja białek jest zaburzeniem struktury cząsteczek białkowych związanych z rozerwaniem wiązań chemicznych” (str. 18) – nie tylko wiązania chemiczne stabilizują strukturę białek (również oddziaływania hydrofobowe, siły van der Waalsa, oddziaływania jonowe). Może trafniej byłoby napisać, iż denaturacja jest związana ze zniszczeniem licznych słabych wiązań stabilizujących cząsteczkę białka. Dodatkowo cyt. „Wszystkie białka ulegają denaturacji w podobnym zakresie temperatur (str. 19)” – chyba trafniej byłoby napisać „większość”, ze względu chociażby np. na polimerazę, która jest termostabilna w zakresie 37-94°C i nie traci swych właściwości w temperaturze denaturacji dla innych białek, jest oporna na wysokie temperatury.

Metodyka badań

Kolejny rozdział to **Metodyka badań**, opisująca materiał pomiarowy, aparaturę pomiarową oraz sposób opracowania wyników. Ze względu na dosyć obszerny i szczegółowy opis, rozdział ten – w moim odczuciu – wprowadza w delikatne zakłopotanie. Z opisu wynika, iż metodyka badań dotyczy 4-ech różnych grup badawczych, tj. sportowców uprawiających sport wspomagany zabiegami sauny fińskiej i krioterapii, suplementacją oraz ultramaratończyków i w ten sposób należałoby podzielić całą dysertację. Wydaje się także, iż z faktu zróżnicowanych grup ten rozdział powinien zostać podzielony na cztery podrozdziały. Dodatkowo „Przygotowanie próbek” powinno stanowić kolejny podrozdział zatytułowany „Przygotowanie próbek do pomiarów DSC” (str. 31,32). Autorka pokazała schemat ideowy aparatu DSC i zasadę jego działania (str. 33,34). Bez szkody dla tego rozdziału można usunąć możliwości techniczne pracy aparatu, uwzględniając tylko zastosowane zakresy parametrów (str. 33,34). Autorka pracy pisze, iż cyt. „Widma były rejestrowane w zakresie długości fal 200-800 nm. Próbkę były badane z szybkością skanowania 400 nm/min w jednym cyklu pomiarowym” (str. 34) – ze względu na możliwości absorpcyjne surowicy, zakres widmowania do $\lambda = 400$ nm jest wystarczającym, przy szybkości skanowania maksymalnie do 100 nm/min. W badaniach związanych ze wspomaganiem sportu kriostymulacją i zabiegami sauny fińskiej podzielono grupę na kobiety i mężczyzn. Tutaj nasuwa się pytanie, czy płeć była czynnikiem mającym wpływ na wyniki badań? Dlaczego nie zbadano takiej samej liczby kobiet i mężczyzn? Z opisu Pani Doktorantki wynika, iż zabiegi kriostymulacji i sauny były przeprowadzane w cyt. „fazie przejściowej okresu przygotowawczego zawodników do startów” – co zatem oznacza faza przejściowa? Czy dobrze rozumiem, że przed i tuż po zawodach? Badania

przeprowadzone przez wykonawców projektu były dosyć obszerne, a interpretacja wyników badań przy tak wielu zmiennych parametrach wymaga także wiedzy na temat uczestników badania. W publikacjach zamieszczono informacje na temat doboru uczestników badania oraz zasady ich wyłączenia z badania. Czy po upływie czasu od przeprowadzenia analiz, istnieją jeszcze inne, dodatkowe kryteria włączenia i wyłączenia z badań, które byłyby pomoce w ustaleniu pewnych zależności? Na str. 31 Doktorantka pisze, iż cyt. „Dodatkowo, dwa razy (przed rozpoczęciem zabiegów i po zakończeniu serii zabiegów) pobrano krew bezpośrednio po wysiłku, 1h po wysiłku i po 24 godzinach regeneracji” – jak wspomniałam na początku, tak obszerny opis budzi dezorientację – brakuje informacji po jakim wysiłku? Czy był to trening siłowy, a może wytrzymałościowy? Ponadto trudno rozumieć zebraną w jednym rozdziale całą metodykę – wydaje się bowiem z lektury pracy, że próbki wśród wszystkich 4-ech grup były pobrane w innym czasie. Jeśli tak, to czy można takie wyniki ze sobą porównywać? Na kształt obserwowanego przejścia endotermicznego oprócz występujących białek w surowicy/osoczu krwi może mieć jednak wpływ wiele czynników zewnętrznych czy fizykochemicznych. Takim czynnikiem jest na przykład rodzaj użytego rozpuszczalnika do przygotowania roztworów badanej substancji. Z treści metodyki badań i z pracy wynika, że surowica była rozcieńczana wodą (str. 32). Czy rozcieńczenie buforem nie wpłynęłoby na mniejsze wahania pH? Wiadomo przecież, iż wskaźnik pH też może być czynnikiem wpływającym na zmiany w widmie DSC. Czy można uznać, iż badania były prowadzone w tych samych warunkach?

Cel pracy

Kolejny rozdział to **Cel pracy** (str. 36), który dotyczy próby zastosowania różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC) do oceny efektów stosowania przez sportowców różnych form wspomagania treningu sportowego. Według mnie rozdział ten powinien zostać rozbudowany o listę prac stanowiących rozprawę i w ten sposób sformułowany, gdyż podobnie jak metodyka badań został on opisany zbyt obszernie i zawiera część informacji, która powinna znaleźć się lub znajduje się rozdział wyżej (np. opis grup badawczych). W związku z tym faktem, z racji pełnienia roli Recenzenta, przytoczę w tym miejscu kilka spostrzeżeń, które budzą we mnie pewną dezorientację. Z treści tego rozdziału wynika, w moim odczuciu, że za pomocą DSC można sprawdzić, jakie właściwości mają metody wspomagania treningowego względem profilu białek? Rozumiem, że ocenie podlega stabilność cieplna, a zmiany stabilności cieplnej związane są ze zmianami funkcji białek. Jak zatem zmiany funkcji białek w odniesieniu do organizmu powoduje wspomaganie treningu? Ponadto rozumiem, że mamy zbadaną krew sportowców przed wysiłkiem, po wysiłku, bez i po zastosowaniu wspomagacza (celem zbadania szybkości regeneracji oraz reakcji organizmu na wysiłek po zastosowaniu wspomagacza). Brakuje związku przyczynowo-skutkowego i ogólnej koncepcji tego projektu. Z lektury wstępu wynika, że mamy cztery grupy badawcze, a w celu pracy (niepotrzebnie w tym miejscu) wyszczególniono trzy, po czym znowu opisano czwartą, jako ultramaratończyków, którym nie podawano suplementów, ani wobec których nie stosowano żadnych zabiegów. W celu pracy nagle pojawił się zwrot CrossFit – dlaczego wcześniej nie stosowano tego określenia? Kolejny niezbyt rzeczowo opisany akapit cyt. „Oceny efektów suplementacji dokonano na podstawie porównywania wyników uzyskanych dla próbek surowicy pochodzących z krwi pobranej od ochotników trenujących CrossFit w dwóch sesjach: przed treningiem i po treningu wspomagany suplementacją GTE. Dane zebrane zostały dla dwóch grup uczestników badania: pierwszą grupę stanowiły osoby otrzymujące placebo, a drugą osoby suplementowane GTE. Porównano otrzymane wyniki dla obu grup na różnych etapach cyklu treningowego – przed i po wysiłku oraz po godzinny odpoczynku” nie jest czytelny. Co oznacza „pierwsza grupa”, „druga grupa”? Nagle pojawia się grupa osób, które nie uprawiają intensywnie

sportu, o czym nie było mowy w Metodocy badań, albo siłowo-wytrzymałościowa (CrossFit) – pojawia się pytanie, czy osoby trenujące CrossFit, to znowu kolejna grupa? – wydaje się, iż w tej części opisowej wymienia się inne osoby stanowiące grupę badanych sportowców, niż te zawarte w Metodocy. Rozumiem, iż każda z opisanych prac dotyczy innych grup, a jedynym wspólnym mianownikiem jest technika DSC i sport. W związku z tym nie ma potrzeby tak szczegółowego opisu, gdyż jest on celowy tylko wtedy, gdy wybrane prace stanowią jeden cykl w stylu „Zastosowanie DSC w ocenie profilu białka surowicy krwi sportowców. Wspomaganie treningów suplementacją. Cz. 1”. „Zastosowanie DSC w ocenie profilu białka surowicy krwi sportowców. Wspomaganie treningów zabiegami sauny fińskiej. Cz. 2”. Badania w każdej z prac przeprowadzone były w nieco innych warunkach, dlatego szczegółowy opis wywołuje pewne zakłopotanie czytając wspólną dla nich wszystkich Metodokę, częściowo zresztą opisaną w bieżącym rozdziale.

Opis badań własnych – synteza

Rozdział ten, który wprawdzie mógłby mieć tytuł „Omówienie i dyskusja wyników”, związany jest z tematyką zaprezentowaną w pracach A1-A6. Podzielony został na trzy podrozdziały opisujące badania, z czego tylko jeden spośród nich dotyczy bezpośrednio celu badań (str. 40). Według mnie punkt. 4.1 i 4.2 dotyczy tego samego problemu, czyli profilu białka osób uprawiających sport (4.1, str. 41), co jest dla mnie równoznaczne z analizą wpływu wysiłku fizycznego (4.2, str. 44). Może jednak pokusić się o inny podział badań? Np. o podział zgodnie z tematyką zaprezentowaną w poszczególnych pracach? Na str. 36 Autorka pisze cyt. „W niniejszym rozdziale omówione zostaną wyniki badań własnych wodnych roztworów surowicy krwi z wykorzystaniem skaningowej kalorymetrii różnicowej (DSC), których **celem było określenie wpływu wysiłku i efektów suplementacji oraz wybranych zabiegów odnowy biologicznej na przebieg procesu termicznej denaturacji białek zawartych w surowicy krwi sportowców**” – pragnę w tym miejscu podkreślić to zdanie, które z powodzeniem powinno stanowić cel pracy – zrozumiałe, przejrzyste, konkretne i ogólne. Mimo różnorodności badań, Pani mgr inż. Duch wykazała się umiejętnością rozwiązywania problemów badawczych, zrealizowała cel pracy, a dyskusja nad wynikami wykazuje znamiona oryginalności. Doktorantka opisując problemy badawcze wspomina, iż istnieje cyt. „możliwość odzwierciedlenia w badaniach DSC surowicy krwi zmian wywołanych w niej treningiem wytrzymałościowym i siłowo-wytrzymałościowym, bezpośrednim wysiłkiem, o wysokiej i ekstremalnie wysokiej intensywności” (str. 39) – jaka jest różnica między „treningiem wytrzymałościowym i siłowo-wytrzymałościowym” a „bezpośrednim wysiłkiem”. Jak odróżnić „wysiłek o wysokiej intensywności” od „wysiłku o ekstremalnie wysokiej intensywności”? Pani Doktorantka słusznie stwierdza, iż cyt. „Należy jednak zaznaczyć, że wyniki charakteryzowały się dość dużą zmiennością osobniczą” (str. 45), ... „Ich liczba jest jednak cechą osobniczą i ogólnie wyróżnić można od dwóch do czterech maksimów lokalnych” (str. 41) – może zasadniczym problemem jest fakt uśrednienia danych? W związku z tym, czy faktycznie nie należałoby pomyśleć podczas planowania następnych badań aby każdego badanego uczestnika projektu analizować osobno, a badania powtórzyć kilkakrotnie, skoro wśród danej grupy nie było wielu przypadków? Tym bardziej, że sama Autorka pracy wspominała, że cyt. „Sugestię tę należałoby jednak potwierdzić przeprowadzając badania w oparciu o bardziej liczne grupy sportowców” (str. 43), oraz „Dobór dawek powinien być dostosowany do indywidualnych potrzeb” (str. 57), z czym się jak najbardziej zgadzam. Ponadto stwierdzenie iż cyt. „dokładny kształt tego przejścia jest dodatkowo uzależniony od modyfikacji struktury białek, np. w wyniku wiązania różnych ligandów oraz interakcji pomiędzy białkami (str. 41)” porusza kwestię, która mnie jako Recenzentowi pracy nasunęła się na myśl już na początku, w takim razie czy można jednoznacznie stwierdzić, że obserwowane zmiany są powodowane uprawianiem

sportu? Na str. 41 Autorka pisze, cyt. „Prezentowane w opublikowanych artykułach naukowych [A1-A6] profile DSC surowic krwi sportowców uzyskane zostały przy zachowaniu tych samych warunków eksperymentalnych, takich jak: rodzaj rozpuszczalnika, stopień rozcieńczenia surowicy, procedura rozmrażania próbki, zakres pomiarowy, szybkość skanowania” – a gdyby również wziąć pod uwagę czas przechowywania, układ odniesienia oraz kryteria włączenia i wyłączenia z badań, o czym wspinałam już wcześniej? Na Rysunku 22 Pani Duch porównała średnie krzywe pochodzące od osób nieaktywnych fizycznie (str. 42). Nasuwa się pytanie dotyczące pochodzenia tego rysunku, czy pochodzi z pracy spośród zestawienia A1-A6? Czy może Doktorantka zrobiła zestawienie na potrzeby syntetycznego omówienia prac? Gdzie są błędy pomiarowe (dotyczy to także Rys. 27, 28, str. 55)? Tak zaobserwowane zmiany mogą być niestety na tyle subtelne, że uwzględniając rachunek błędów nie będą one istotne. W kolejnej części pracy Autorka stwierdza, że cyt. „Poza głównym nurtem badań, przeprowadzono wstępną analizę krzywych spoczynkowych surowicy krwi sportowców reprezentujących różne dyscypliny sportowe, a wyniki zostały zaprezentowane na konferencji Pomiędzy naukami” (str. 42) – niestety z celu pracy nie wynika, iż wyszczególniono główne i poboczne nurty badawcze, zatem ten fragment wymaga wyjaśnienia, jak również charakterystyka wspomnianej w tym miejscu krzywej spoczynkowej. Podobnie na Rysunku 23 zaprezentowano spoczynkowy profil DSC surowicy różnych sportowców (str. 42) – przed, po czy w trakcie treningu? Czy takie dane są ze sobą słusznie zestawione? Na str. 42 zamieszczono stosunek wartości Cp3/Cp1 – według mojej opinii zależność ta powinna zostać omówiona w metodyce.

Wykaz artykułów stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej wraz z oświadczeniami współautorów

Rozdział ten to udokumentowany wkład w powstaniu artykułu wszystkich współautorów. Moim zdaniem brakuje informacji, czy w publikacji/w badaniach dotyczących recenzowanej pracy doktorskiej Pani Doktorantka miała/mogła mieć wiodący udział. Można się jedynie domyślić o Jej wiodącym udziale w pracy związanej z eksperymentem DSC – w pracy A1 Doktorantka uczestniczyła w części pomiarów DSC, analizie danych, brak informacji o udziale w pisaniu pracy a w pozostałych pracach A2-A6, potwierdziła udział w części pomiarów DSC, analizie danych oraz w pisaniu pracy.

Podsumowanie

Uważam, że rozdział ten powinien zostać wzbogacony o wnioski, zwłaszcza, że prace, które Pani Doktorantka charakteryzuje, są bardzo różnorodne. Struktura rozdziału jest poprawna, podział zgodny z tematyką zawartą w poszczególnych pracach tworzy logiczną całość.

A1 – z badań biochemicznych próbek surowicy krwi pobranych od osób uprawiających CrossFit wynika, że suplementacja ekstraktem z zielonej herbaty GTE może mieć łagodzący wpływ na potreningowe uszkodzenia mięśni. Jednakże analiza przeprowadzona przez Doktorantkę za pomocą skaningowej kalorymetrii różnicowej DSC nie wykazała wyraźnego wpływu treningu ani suplementacji GTE na endotermiczne przejście związane z denaturacją białek surowicy. Brak jakichkolwiek statystycznie istotnych różnic pomiędzy uśrednionymi wartościami parametrów przejścia mógł być spowodowany zaobserwowaną dużą zmiennością osobniczą – DSC nadaje się do analizy, ale podejście indywidualne do każdej próby jest wymagane.

A2 – Doktorantka zaobserwowała niewielki, ale zauważalny techniką DSC wpływ kriostymulacji ogólnoustrojowej na zmiany pojemności cieplnej towarzyszące procesowi denaturacji termicznej białek surowicy krwi w elitarnej grupie narciarzy biegowych.

A3, A4 – udało się Doktorantce udokumentować wpływ intensywnego wysiłku na kształt i parametry termodynamiczne przejścia endotermicznego reprezentującego denaturację białek surowicy krwi narciarzy biegowych.

A5 – uzyskane przez Doktorantkę rezultaty badań wskazują, że ćwiczenia wykonywane przez sportowców po serii zabiegów w saunie wywołują krótkotrwałą zwiększoną modyfikację proteomu surowicy krwi, w odniesieniu do analogicznych ćwiczeń wykonywanych podczas sesji poprzedzonej zabiegami WBC.

A6 – rezultaty badań kalorymetrycznych przeprowadzonych przez Panią Duch ujawniły zmiany w proteomie surowicy krwi uczestników 12 – godzinnego biegu ultramaratońskiego. Doktorantka pokazała, że wyczerpujący wysiłek fizyczny zmienia przebieg procesu termicznej denaturacji białek surowicy.

Spis rysunków i Bibliografia

Ta część pracy to zakończenie opracowania przygotowanego przez Doktorantkę. Pani mgr inż. wykorzystwała 241 naukowych pozycji bibliograficznych, z czego aż 85% to publikacje międzynarodowe w języku angielskim. Na podkreślenie zasługuje umiejętność wykorzystywania najnowszej literatury przedmiotu i liczne odwołania do najnowszych badań światowych w podjętej tematyce. Publikacje wydane w okresie ostatnich 5 lat stanowią około 33% całości literatury, co w obecnie występującej wysokiej dynamice obiegu wiedzy w nauce jest w pełni zadowalającym wskaźnikiem. Pod względem jakościowym literatura jest dobrana prawidłowo, ponadto jest zróżnicowana i bogata.

2.6 Język i formalna strona rozprawy

Prócz uwag, sugestii i pytań (nie wątpię w poprawne na nie odpowiedzi), które mogą stanowić element dyskusji, a wynikają z mojej ciekawości tematu pracy, zainteresowania techniką DSC i wnikliwości w prezentowane zagadnienia kilka drobnych uwag/sugestii:

- Cytacja [45-46] – zamiast „-„, powinien być przecinek. Nie ma potrzeby przy dwóch sąsiadujących ze sobą zdaniach podawać te same cytacje (str. 10).
- „Podczas 48 godzinnego głodzenia dochodzi do rozwoju kwasicy metabolicznej, której towarzyszy spadek stężenia wodorowęglanów....” – raczej spadek pH krwi związany jest z pierwotnym zmniejszeniem jonów HCO_3^- (str. 11).
- Cytacja [58,60] oraz [60] – w kilku sąsiadujących ze sobą frazach nie ma potrzeby kilka razy cytować te same pozycje (str. 11-13).
- „Naczynka pomiarowe” – naczynka pomiarowe (str. 13).
- Brak odniesień literaturowych przy większości wzorów (np. 1,2,5-9), brak objaśnień do wzorów, jednostek (str. od 13)
- „Pojemność cieplna” – brakuje skrótu „Cp” (str. 14).
- „Zmian entalpii” – brakuje symbolu dH , „powiązana z entropią S ” – ze zmianą entropii dS (str. 14).
- „Metodą DSC” – powinno być „techniką DSC” (str. 15).
- Rysunek 3 – słaba jakość (str. 15).
- „na rysunku 4, na rys. 4” – należy ujednolicić zarówno zwrot, jak i podjąć decyzję w kwestii doboru wielkości litery – mała czy wielka (str. 16, 17).
- Rysunek 6 – opisy w języku polskim (str. 18).
- Cytacja Garbet i wsp. na końcu zdania (str. 21).

- Rysunek 12 – bardzo słaba jakość (str. 23).
- [147][148] – obie pozycje wspólnie w jednym nawiasie [147,148] (str. 26).
- „Związki te należą do grupy antyoksydantów. Powodują hamowanie starzenia się komórek, rozwoju nowotworów i zapobiegają chorobom układu krążenia, zwiększają także metabolizm tłuszczów w spoczynku i podczas ćwiczeń. Zielona herbata jest także źródłem witaminy B, C, E, K, karotenoidów, chromu, seleniu i magnezu” – brakuje cytacji (str. 27).
- „Ilość białka całkowitego w próbkach surowicy oznaczano metodą biuretową” – źródło metody (str. 32).
- *Szerokość połówkowa*, z ang. *Full Width at Half Maximum*, czyli FWHM. Jeśli HHW oznacza „Szerokość połówkową przejścia”, proszę o tłumaczenie angielskie (str. 35).
- „Rezultaty prowadzonych badań, stały się podstawą opracowania sześciu spójnych tematycznie artykułów naukowych, których jestem współautorem”- bądź autorem (praca A2, A4) (str. 37).
- „Wyniki pracy badawczej pośrednio związane z zakresem pracy doktorskiej zebrano w dwóch artykułach naukowych”...., „Prace te nie zostały włączone do rozprawy” ..., „Rezultaty badań były również prezentowane na poniżej wymienionych konferencjach naukowych w formie prezentacji lub posterów”– rozumiem, że prace te stanowią element dorobku naukowego – karty pracy doktorskiej powinien zasilić przebieg kariery naukowej Doktorantki a do wymienionych konferencji należy dodać udział Doktorantki (czynny, bierny) oraz tytuły prezentowanych prac (str. 37,38).
- „W pracach stanowiących podstawę doktoratu, możemy wyróżnić następujące problemy badawcze” – doktorat = rozprawa doktorska = dysertacja – myślę, że bardziej stosowne byłoby użycie któregoś z synonimu słowa doktorat (str. 39). Ponadto przy każdym problemie badawczym należałoby umieścić nr pracy.
- „ekstarktu z zielonej herbaty” – ekstraktu (str. 39)
- Alanina nie jest aminokwasem rozgałęzionym (str. 43).
- ...”Dalsze badania związane z bieżącą pracą dokorską” – należy dodać która praca/prace? (str. 45).
- Skoro artykuł B2 nie został włączony do rozprawy, bez szkody dla pracy powinien zostać ujęty w bibliografii (str. 41, drugi i trzeci akapit).
- „powtarzalne wzory krzywych DSC” – wzory, a może przykładowe krzywe DSC (str. 41)?
- ...”Uwalnia organizm od wolnych rodników” – należy dobrać inne określenie będące synonimem słowa „uwalnia” – redukuje/reguluje/ogranicza wpływ na... (str. 54).
- ...”w sposób uchwytany tą techniką” – co to oznacza? (str. 58).
- Pewna ilość cytacji jest niekompletna, brak daty korzystania ze stron internetowych, brak informacji jakie jest pochodzenie pozycji (czasopismo, książka itp.) – bibliografia pozycje [45,46,49,89,128,133,140,141,143,144,147,149,155-158,177,179,185,186]. Ponadto unika się pisania słowa „tom”.

3. WNIOSKI I KONKLUZJA KOŃCOWA

Wysiłek fizyczny może wpływać na gospodarkę węglowodanową, prowadzić do zagęszczenia krwi wskutek utraty wody, skutkować zwiększonym zużyciem substancji dostarczających organizmowi energii, takich jak glukoza czy trójglicerydy. Ponadto podczas wysiłku produkowane są enzymy, które

po przeniknięciu do surowicy krwi wpływają na wybrane parametry informujące o stanie wątroby (m.in. AST, LDH). Kinaza kreatynowa (CK), to enzym biorący udział w reakcji przemiany fosfokreatyny w ATP w pierwszych sekundach zwiększone wysiłku fizycznego. CK występujący głównie w mięśniach szkieletowych (izoenzym CK-MM) oraz mięśniu sercowym (CK-MB). Można wyróżnić CK-BB (znajdującą się głównie w mózgu). W trakcie wysiłku fizycznego dochodzi do mikrourazów komórek mięśni szkieletowych, a co za tym idzie do zwiększonej przepuszczalności błon komórkowych. Stężenie CK w mięśniach jest duże, a zwiększona przepuszczalność błon komórkowych powoduje wzrost stężenie CK w surowicy krwi, a zmiana aktywności tego enzymu może posłużyć do oceny wpływu obciążeń treningowych na mięśnie szkieletowe. Do niedawna wysokie stężenie CK w surowicy stosowane było jako kryterium wystąpienia choroby niedokrwiennej serca. Ogólnoustrojową reakcją na wysiłek jest zmiana stężenia hormonów. W wyniku aktywności fizycznej rośnie poziom adrenaliny, kortyzolu, glukagonu, hormonu adrenokortykotropowego (ACTH), obniża się natomiast poziom testosteronu. Wszystko to sprawia, że lekarz, który interpretuje wyniki badań, może dopatrzeć się nieprawidłowości i stwierdzić istnienie schorzeń nawet wtedy, kiedy pacjent jest zdrowy. Może zdarzyć się również, że inne parametry, które powinny zostać przeanalizowane przez specjalistę, zostaną przeoczone z powodu odchyłań wywołanych aktywnością fizyczną. W punktu widzenia klinicznego warto również zwrócić uwagę na ocenę stężenia mleczanów we krwi. Mleczany powstają jako produkt uboczny wysiłku fizycznego, a ich stężenie wzrasta wraz z intensywnością treningu. Przytoczone przeze mnie powyższe informacje dziś nie są nowością naukową, niemniej jednak przedstawiona do recenzji praca ma charakter badań podstawowych, stanowi oryginalny i twórczy wkład w rozwój dyscypliny nauk fizycznych, podkreśla zastosowanie DSC do szybkiej oceny osocza jako wstępnego badania będącego pierwszym etapem na drodze pozyskania pełnego panelu informacji na temat stanu zdrowia sportowca. Mając na uwadze wartość merytoryczną prac zaprezentowanych w niniejszym opracowaniu, postawione hipotezy i odpowiedzi zawarte w nich (włącznie z krytycznym podejściem do otrzymanych wyników i sugestii dotyczącej zwiększenia grupy badawczej, czy potraktowania każdego uczestnika badania indywidualnie) oceniam pozytywnie przedstawioną mi do recenzji rozprawę doktorską podkreślając dojrzałość naukową Doktorantki, umiejętność pracy w zespole i wnikliwość w interpretację trudnych i wciąż eksplorowanych widm różnicowej kalorymetrii skaningowej surowicy krwi.

W związku z powyższym, wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Fizyki o dalsze procedowanie niniejszej rozprawy doktorskiej, mając na uwadze, że spełnia wymogi formalne i merytoryczne stawiane dysertacjom doktorskim określone w obowiązujących przepisach ustawowych – Prawa o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789)).

Łączę wyrazy szacunku,

dr hab. n. farm. Małgorzata Maciążek-Jurczyk, prof. SUM

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Farmacji Fizycznej
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach
Małgorzata Jurczyk
dr hab. n. farm.
Małgorzata Maciążek-Jurczyk prof. SUM