

Dr hab. n. med. Mirosław Bik-Multanowski  
Kierownik Zakładu Genetyki Medycznej  
Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum  
Ul. Wielicka 265, 30-663 Kraków

Recenzja pracy doktorskiej  
mgr Joanny Orysiak  
„Występowanie polimorficznych wariantów genów *ACE* i *ACTN3* u polskich sportowców”

Trening fizyczny umożliwia spektakularny wzrost wydolności fizycznej jednak jest rzeczą oczywistą, że końcowy efekt uzależniony jest nie tylko od ilości włożonej pracy ale również od predyspozycji danej osoby.

Możliwości podniesienia wydolności fizycznej organizmu w odpowiedzi na trening wydają się w znacznej części zależne od predyspozycji genetycznych (według niektórych badawczy nawet w 50-60%). Pomimo intensywnych badań dotychczas nie wypracowano jednak „profilu genetycznego” gwarantującego danemu sportowcowi sukces treningu i osiągnięcie światowej klasy.

Przedstawiona mi do recenzji praca została zrealizowana w Zakładzie Fizjologii Żywienia Instytutu Sportu w Warszawie – jednym z wiodących polskich ośrodków prowadzących badania nad czynnikami modyfikującymi zdolności adaptacyjne organizmu do wysiłków fizycznych. Stanowi ona rozwinięcie wieloletniego zainteresowania Ośrodka podłożem wrodzonych predyspozycji do uprawiania sportu.

Praca ma objętość 95 stron i posiada typowy układ stosowany w rozprawach doktorskich z podziałem na: wprowadzenie, cel, zadania badawcze, materiał i metody, wyniki badań, dyskusja, podsumowanie i wnioski oraz streszczenie (w wersji polskiej i angielskiej). W tekście pracy znajduje się 28 tabel oraz 2 ryciny i 3 fotografie. Piśmiennictwo obejmuje 180 pozycji, pochodzących głównie z ostatnich kilku lat. Dominują wśród nich pozycje anglojęzyczne.

We wprowadzeniu Autorka przedstawia aktualne poglądy dotyczące genetycznych uwarunkowań efektywności treningu sportowców z uwzględnieniem najważniejszych wskaźników wydolnościowych i biomechanicznych i ich poligenowego charakteru. Następnie wprowadza pojęcie zmienności genetycznej i wylistowuje około 30 najbardziej znanych wariantów genowych będących w kręgu zainteresowań genetyki sportowej w ostatnich latach, pozycjonując rolę tych wariantów wobec zjawisk biologicznych takich jak: wytrzymałość, siła i szybkość skurczu mięśnia, wrażliwość na uszkodzenia i kontuzje oraz uwarunkowania psychologiczne. W końcu obszernie przedstawia rolę genu konwertazy angiotensyny (*ACE*) z jego polimorfizmem w intronie 16 oraz genu alfa-aktyniny (*ACTN3*) i wariantu R577X tego genu. Wprowadzenie uzupełnione jest szczegółowym przeglądem dotychczasowych badań roli powyższych wariantów w odniesieniu do szybkości i siły mięśniowej oraz wytrzymałości sportowców.

W rozdziałach „Cel badań” i „Zadania badawcze” Autorka skupia się na roli wariantów genów *ACE* i *ACTN3* jako czynników określających predyspozycje do uprawiania sportów szybkościowo-siłowych i wytrzymałościowych.

Rozdział „Materiał i metody” określa badaną populację (626 sportowców należących do krajowej elity zawodników reprezentujących 14 dyscyplin sportowych).

Sekretariat Dziekana Wydz. WFSM

L. dz. DUFBR / 1185 / 14  
Wpl. dnia 5.11.14 Barbara

Autorka przedstawia charakterystykę antropometryczną poszczególnych grup z uwzględnieniem podziału na kobiety i mężczyzn. Ponadto przedstawia techniki badań molekularnych (PCR i PCR-RLFP) i testów wysiłkowych (ergometr wiosłarski), które planuje wykorzystać. Opisuje również metody planowanej analizy statystycznej.

Rozdział „Wyniki badań” obejmuje szczegółową analizę potencjalnych różnic częstości badanych polimorfizmów pomiędzy podgrupami zawodniczek i zawodników reprezentujących poszczególne dyscypliny sportowe a także grupę dyscyplin szybkościowo-siłowych i wytrzymałościowych. W odniesieniu do polimorfizmu genu *ACE* autorka nie stwierdza statystycznie istotnych różnic pomiędzy badanymi grupami natomiast w przypadku genu *ACTN3* obserwuje polaryzację genotypów z wyższą częstością allele R w grupie dyscyplin szybkościowo-siłowych i allele X w grupie dyscyplin wytrzymałościowych. Szczegółowe wyniki przedstawione są w 12 tabelach opisujących częstość poszczególnych genotypów oraz częstość alleli polimorficznych genów *ACE* i *ACTN3* z zaznaczeniem ewentualnie obecnych statystycznie istotnych różnic pomiędzy analizowanymi grupami.

Dyskusja koncentruje się na zagadnieniach występowanie badanych wariantów genowych u zawodników sportów wytrzymałościowych i szybkościowo-siłowych oraz asocjacji badanych genotypów i wskaźników wysiłkowych u wiosłarzy.

Praca podsumowana jest czterema wnioskami odpowiadającymi na postawione wcześniej pytania. Założenia, metodyka i wyniki podsumowane są ponadto w zwięzły sposób w streszczeniu.

Przedstawiona mi do recenzji praca jest interesująca, dobrze poprowadzona, opiera się na prawidłowych założeniach i prawidłowo dobranych metodach badawczych. Z uznaniem należy odnotować następujące aspekty:

- We wstępie Autorka w sposób wyczerpujący prowadzi analizę dostępnego piśmiennictwa, cytując około 30 różnych badań dotyczących roli dwóch najbardziej znanych wariantów genowych potencjalnie wpływających na wyniki osiągane przez sportowców
- Badanie dotyczy wyjątkowo licznej grupy wysokiej klasy sportowców (626 osób). W moim odczuciu jednym z najtrudniejszych jeżeli nie najtrudniejszym elementem badania jest zgromadzenie odpowiedniej wielkości próby – w tym wypadku dotarcie do odpowiednio dużej grupy profesjonalnych sportowców
- Metodyka badań jest powtarzalna, procedury jasne, zebrane dane dokładne
- Wnioski zawarte w pracy są ostrożne, starannie konfrontowane z danymi z piśmiennictwa
- Praca cechuje się wysoką starannością edytorską, wszystkie prace wymienione w rozdziale „Piśmiennictwo” są adekwatnie cytowane w tekście

Pomimo ogólnie pozytywnej oceny pracy, z obowiązku recenzenta, wypada jednak wspomnieć o kilku aspektach, których uwzględnienie w moim odczuciu zwiększyłoby wartość przedstawionej dysertacji:

- W badaniach asocjacyjnych dotyczących wariantów genowych bardzo użytecznym pojęciem jest tzw. częstość alleliczna. Wprowadzenie tego pojęcia oraz zastosowanie znanego w genetyce populacyjnej prawa Hardy’ego i Weinberga umożliwiłoby ocenę zrównoważenia badanej populacji. Ocena taka pozwala na zwiększenie wiarygodności wniosków z badań asocjacyjnych w niewielkich grupach (i mogłaby pomóc na przykład przy analizie częstości genotypu XX genu *ACTN3* w grupie kajakarek – „Dyskusja” str. 67).
- Nie została przeanalizowana wielkość populacji niezbędna do uzyskania wiarygodnego wyniku analizy statystycznej. Większe jednorodne grupy

obejmowały siatkarzy (59 mężczyzn) i wioślarzy (105 mężczyzn, z tego 66 zbadanych przy pomocy testu na ergometrze wioślarskim). W stosunku do mniejszych grup analiza wielkości próby byłaby moim zdaniem przydatna.

- W pracy nie podano poziomów istotności statystycznej a także wartości ilorazu szans z 95% przedziałem ufności – procedura taka pozwala oszacować tzw. ryzyko względne czyli wartość o jaką wzrasta prawdopodobieństwo zaistnienia zjawiska biologicznego przy obecności danej cechy w grupie badanej.

Ponadto nasuwa się kilka drobnych uwag:

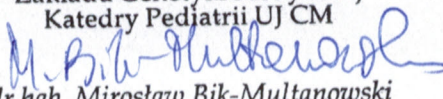
- Kryterium odróżniającym mutację od polimorfizmu jest nie tylko częstość <1% ale również patogenność. Aktualnie sugeruje się stosowanie terminu „wariant genowy”.
- W metodyce reakcji PCR nie podano stężeń starterów, co może utrudnić dokładne odtworzenie warunków badania czytelnikom pracy zainteresowanym przeprowadzeniem podobnego eksperymentu. Podano natomiast napięcie prądu stosowanego w trakcie elektroforezy produktów reakcji na żelu agarozowym podczas gdy wartość napięcia jest zależna od wielkości żelu.
- W dyskusji powołano się na badania Hagberga i wsp. z roku 2011, oceniające minimalną wielkość grupy niezbędnej do oceny roli pojedynczego polimorfizmu typu SNP na 1400 osób. Przeprowadzenie wiarygodnego badania asocjacyjnego możliwe jest również w mniejszych grupach pod warunkiem odpowiednio częstego stwierdzania danej cechy.
- Duży rozrzut w ocenie roli dziedziczalności w stosunku do niektórych wskaźników wydolnościowych i biomechanicznych (nawet do 60%; tabela 1) jest bardzo zastanawiający. W dyskusji można by rozważyć ewentualną rolę innych czynników (czynniki epigenetyczne, miRNA, lncRNA) czy też rolę innych genów i szlaków genowych (dla przykładu w fosforylację oksydacyjną zaangażowanych jest około 1200 spośród prawie 30000 genów człowieka).

Przedstawione powyżej zastrzeżenia nie umniejszają jednak ogólnie wysokiej wartości pracy. Wyniki badań przedstawiono rzetelnie i nie budzą one wątpliwości. Ponadto, godna podkreślenia jest ostrożność i wyważenie Autorki przy wyciąganiu wniosków z uzyskanych danych.

Wydaje się, że logicznym kolejnym krokiem doktorantki powinno być przeprowadzenie metaanalizy danych z cytowanego piśmiennictwa, ocena zrównoważenia przebadanych populacji i ich podobieństwa do przebadanej populacji polskiej a następnie przygotowanie publikacji, która z dużą wiarygodnością mogłaby zweryfikować rzeczywisty jakościowy i ilościowy wpływ wariantów genów *ACE* i *ACTN3* na efektywność treningu sportowców.

Podsumowując, przedstawioną mi do recenzji pracę oceniam wysoko. Spełnia ona w moim odczuciu wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim i kwalifikuje Doktorantkę do nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk o kulturze fizycznej. Zwracam się zatem do Wysokiej Rady Wydziału Wychowania Fizycznego, Sportu i Rehabilitacji AWF w Poznaniu o dopuszczenie mgr Joanny Orysiak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kraków, 23.10.2014  
ZAKŁAD GENETYKI MEDYCZNEJ  
Katedry Pediatrii  
Polsko-Amerykańskiego Instytutu Pediatrii  
Wydziału Lekarskiego UJ  
30-663 Kraków, ul. Wielicka 265  
tel. 658-02-36, fax: 658-44-46

P.O. KIEROWNIKA  
Zakładu Genetyki Medycznej  
Katedry Pediatrii UJ CM  
  
dr hab. Mirosław Bik-Multanowski