

dr hab. Jarosław Marusiak, prof. nadzw.  
Akademia Wychowania Fizycznego we Wrocławiu  
Al. I.J. Paderewskiego 35, 51-612 Wrocław

#### Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani mgr Zuzanny Dobrzyńskiej  
pt. „Zmiany cech skurczu i potencjałów czynnościowych jednostek ruchowych w czasie  
rozwoju osobniczego w mięśni bruchatym przyśrodkowym łydki samców szczura”

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest typową, eksperymentalną pracą, której głównym celem jest poszerzenie wiedzy o zmianach rozwojowych jednostek motorycznych mięśni szkieletowych. Generalna idea niniejszej pracy polega na zbadaniu cech skurczu pojedynczego oraz tężcowego włókien mięśniowych trzech typów jednostek motorycznych mięśnia bruchatego przyśrodkowego łydki, czynności bioelektrycznej tego mięśnia, oraz cech morfologicznych u szczurów w trzech grupach wiekowych, tj. u osobników 1-miesięcznych, 2-miesięcznych oraz 9-miesięcznych. Warto podkreślić, że pomiary dla pierwszego etapu rozwoju wykonywano w okresie 1-miesiąca po urodzeniu, ponieważ w tym czasie w mięśniach szkieletowych badanych szczurów dochodzi do: (i) zaniku unerwienia polineuralnego; oraz do (ii) zastępowania izoform embrionalnej i neonatalnej ciężkiego łańcucha miozyny przez izoformy: I – (typ wolny) oraz IIA, IIX, IIB (typy szybkie); które odpowiadają wyodrębnionym w tym okresie wszystkim typom jednostek motorycznych (S, FR, FI i FF). Dlatego, dobór szczurów właśnie w tych trzech grupach wiekowych dał możliwość zbadania cech wszystkich jednostek motorycznych w różnych okresach ich rozwoju, począwszy od okresu ich wczesnego wyodrębnienia (grupa 1m), poprzez okres dojrzewania (grupa 2m), aż do okresu dorosłości (9m). Wiek badanych szczurów od 1 do 9 miesięcy obejmuje zakres czasu, w którym zarówno w mięśniach szkieletowych jak i w całym organizmie zachodzą zmiany na ogromną skalę, czego dobrym odzwierciedleniem może być zbadany w tej pracy czterokrotny wzrost masy badanego mięśnia, z jednoczesnym trzykrotnym wzrostem masy ciała. Dostosowanie procesów sterowania jednostkami motorycznymi przy wzrastającej masie mięśnia i ciała, oraz zmieniającej się specyfice ruchów związanej z uczeniem się różnego typu aktywności ruchowych przez szczura, jest niezwykle skomplikowanym i wieloaspektowym zjawiskiem. Poznanie tych procesów ma ogromne znaczenie poznawcze, ponieważ daje podstawy do zrozumienia zmian mechanizmów sterowania ruchem w trakcie rozwoju osobniczego. W literaturze światowej jest niewiele danych dotyczących rozwoju jednostek motorycznych w procesie dojrzewania, a opublikowane doniesienia naukowe nie dają spójnego całościowego obrazu tego zjawiska. Niniejsza praca po raz pierwszy ukazuje zmiany zachodzące we wszystkich trzech typach jednostek motorycznych, w procesie dojrzewania układu nerwowo-mięśniowego u szczurów. Dlatego uważam, że podjęty przez Autorkę przedmiot rozprawy doktorskiej jest uzasadniony i oryginalny, oraz stanowi znaczący krok dla wyjaśnienia mechanizmów zmian dostosowawczych cech jednostek motorycznych mięśni szkieletowych, związanych z rozwojem osobniczym.

Rozprawa obejmuje 75 stron maszynopisu i ma klasyczny układ, stosowny dla struktury pracy eksperymentalnej: wstęp, materiał i metody, wyniki oraz dyskusja. Na zakończenie przedstawione są główne wnioski wypływające z wyników i dyskusji. Piśmiennictwo cytowane w pracy obejmuje 102 pozycje (w tym 7 pozycji zwartych i 95 artykułów naukowych z renomowanych czasopism naukowych), z których niemal wszystkie bo 101 to pozycje anglojęzyczne, a 13 z nich pochodzi z ostatnich 8 lat

(2008-2016). Powyżej scharakteryzowane piśmiennictwo świadczy o starannie wykonanym przez Doktorantkę doborze i przeglądzie literatury.

Wstęp rozprawy stanowi przegląd literatury w odniesieniu do: (i) aspektów budowy i zróżnicowania cech jednostek motorycznych, z uwzględnieniem znaczenia rozwojowej transformacji izoform łańcuchów ciężkich miozyny do typu dorosłego; (ii) fizjologicznych metod klasyfikacji jednostek motorycznych i szacowania ich właściwości skurczu; (iii) czynników wpływających na rozwój komponenty nerwowej i mięśniowej jednostek motorycznych, z uwzględnieniem wpływu hormonów tarczycy oraz czynników troficznych; oraz do (iv) stanu wiedzy na temat rozwojowych zmianach cech skurczu jednostek motorycznych. Powyższy przegląd literatury jest wystarczającym wprowadzeniem w tematykę naukową rozprawy, a jednocześnie wyraźnie wskazuje czytelnikowi lukę literaturową w zakresie wiedzy dotyczącej zmian rozwojowych cech skurczu trzech typów jednostek motorycznych w procesie dojrzewania mięśni szkieletowych, która stanowi przesłankę do podjęcia niniejszej pracy naukowej. Cel naukowy pracy został jasno i szczegółowo określony. W ostatniej części wstępu autorka sformułowała jeden ogólny i trzy szczegółowe pytania badawcze, na które postanowiła odpowiedzieć realizując opisane w tej części wstępu zadania badawcze.

Metodologia doświadczeń prezentowanych w niniejszej pracy jest wieloetapowa, skomplikowana i wymagająca dużej precyzji (znieczulenie zwierząt i zabieg chirurgiczny, funkcjonalna izolacja i klasyfikacja trzech typów jednostek motorycznych mięśnia brzuchatego przyśrodkowego łydki, zastosowanie różnych protokołów stymulacji elektrycznej jednostek motorycznych, pomiar i analiza parametrów siły i czynności bioelektrycznej mięśnia), co świadczy o bardzo zaawansowanym charakterze prezentowanych w niniejszej rozprawie badań. Szczegółowy oraz prawidłowy pod względem metodologicznym, a jednocześnie przystępny w lekturze opis wszystkich procedur badawczych dowodzi, że Autorka rozprawy opanowała warsztat badawczy. Powyższy opis metod badań oraz materiału badawczego jest w zdecydowanej większości wyczerpujący dla umożliwienia powtórzenia tych badań przez innych. Dobór materiału badawczego jest prawidłowy (podział samców szczurów szczepu Wistar na trzy grupy wiekowe: I'sza - 5 szczurów 1-miesięcznych, II'ga - 6 szczurów 2-miesięcznych i III'cia - 4 szczury 9 miesięczne), co stwarza możliwości wyciągania opartych na wynikach wniosków dotyczących zmian rozwojowych jednostek motorycznych w procesie dojrzewania mięśni szkieletowych. Metody analizy statystycznej zostały prawidłowo dobrane do zastosowanego modelu badawczego, co jest gwarancją wysokiego stopnia wiarygodności wyników. Metodologia zawiera również informację o tym, że badania uzyskały akceptację komisji bioetycznej i wykonane zostały zgodnie z zasadami przewidzianymi dla eksperymentów na zwierzętach. Pomimo szczegółowego opisu metodologii badawczej, mam jednak kilka pytań, na które nie znalazłem odpowiedzi w tekście tego rozdziału, a które to kwestie uważam że istotne. W opisie metodologii pomiaru brakuje informacji o powodzie wyboru lewej kończyny tylnej szczura do niniejszych badań. Czy wybór ten był spowodowany jednakową lateralizacją u wszystkich szczurów? Czy u szczurów przeprowadza się test na lateralizację badanej kończyny? W opisie rejestracji największej siły skurczu pojedynczego jednostek motorycznych pojawia się informacja, że biernie rozciągnano mięśnie z siłą 50 mN u młodych i 100 mN u dorosłych szczurów. Brakuje natomiast informacji o wielkości względnego rozciągnięcia mięśnia brzuchatego przyśrodkowego. Powyższa informacja jest ważna ze względu na wpływ wyjściowej długości mięśnia na wielkość generowanej siły oraz na parametry elektromiogramu tego mięśnia. Zatem, czy względna wartość wstępnego rozciągnięcia była identyczna dla wszystkich szczurów i dla pomiarów w trzech typach jednostek motorycznych? W opisie procedury pomiaru czynności bioelektrycznej mięśnia znajduje się informacja o rejestracji bipolarnej, wykonywanej w środkowej części brzusca mięśnia. Brakuje natomiast informacji o położeniu

obu elektrod w stosunku do strefy innerwacji, oraz o odległości między dwoma elektrodami. Kwestia ta jest ważna, ponieważ lokalizacja elektrod i odstęp między nimi ma wpływ na wartości analizowanych parametrów elektromiogramu. Czy wartości tych odległości były stałe dla pomiarów w poszczególnych grupach szczurów? W opisie klasyfikacji jednostek na szybkie i wolne brakuje informacji na temat testu 20 Hz. Informacja ta pozwoliłaby czytelnikowi lepiej zrozumieć interpretację klasyfikacji jednostek szybkich i wolnych w odniesieniu do wartości równej 2.0 w tym teście. W ostatniej części metodologii w punkcie 5.3.2. (pierwsze zdanie tego punktu) Autorka napisała, że jednostki motoryczne podzielono na trzy typy na podstawie objawu ugięcia. Powyższy błąd rozumiem jako przejęzyczenie, a nie świadome działanie, ponieważ w dalszej części opisu Autorka wyjaśnia, że spośród wyróżnionych szybkich i wolnych jednostek motorycznych, dodatkowy rozdział na szybkie odporne i męczliwe został dokonany na podstawie wartości wskaźnika zmęczenia.

Wyniki każdej pracy są niewątpliwie najważniejszą i najbardziej oczekiwaną, zarówno przez twórcę, jak i czytelnika częścią dzieła naukowego. Zanim jednak przejdę do omówienia wartości merytorycznej wyników, odniosę się do technicznych aspektów przedstawienia rezultatów tej pracy. Wyniki zostały przedstawione na 9 rycinach i w dwóch tabelach. Wartości szacowanych parametrów przedstawione są w logiczny sposób, przy użyciu jednolitego systemu skrótów dla trzech grup szczurów (1m, 2m, 9m jako odpowiednio: zwierzęta jedno-, dwu- i dziewięć-miesięczne, które można traktować jako odpowiednio młode, dojrzewające i dorosłe) i dla trzech typów jednostek motorycznych (S, FR, FF jako odpowiednio jednostki: wolne, szybkie odporne i szybkie męczliwe). Wyniki prezentowanej pracy doktorskiej dotyczą analizy porównawczej, pomiędzy powyższymi trzema grupami szczurów, dla parametrów opisujących: (i) cechy morfologiczne zwierząt; (ii) klasyfikację i proporcje trzech typów jednostek motorycznych; oraz (iii) cechy skurczu mięśnia (pojedynczego i tężcowego) i cech potencjałów czynnościowych dla trzech typów jednostek motorycznych. Mimo bardzo dużej staranności w opisie wyników, Autorka popełniła kilka drobnych poniżej wskazanych uchybień. W punkcie 6.1, w opisie dotyczącym charakterystyki morfologicznej, brakuje omówienia zmian: długości mięśnia (których wartości umieszczono w Tab. 1) oraz zmian długości nerwu (te dane umieszczono w podsekcji 6.4 poświęconej opisowi potencjałów czynnościowych). W tym samym punkcie (6.1), przy opisie wyników stosunku masy mięśnia do masy ciała Autorka podaje wartości tego parametru w trzech formach (tekst, Tab. 1, Ryc. 6.1). Również w punkcie 6.2 informacja o procentowym udziale jednostek motorycznych poszczególnych typów jest zdublowana (w tekście i na Ryc. 6.2). W obu przypadkach (punkty 6.1 i 6.2), należałoby przedstawić wyniki tylko w jednej formie. Załączone ryciny i tabele są czytelne i informatywne. Jednakże, dla zapewnienia całkowitej „samowystarczalności informacyjnej” wszystkich tabel i rycin należałoby: (i) uzupełnić ich podpisy o wyjaśnienia skrótów dla badanych grup szczurów (1m, 2m, 9m: rycina 6.1, 6.2, 6.5, 6.6, 6.8, 6.9 i Tab. 1) oraz typów jednostek motorycznych (S, FR, FF: rycina 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.7, 6.9) oraz (ii) podpisać nazwę parametru na osi pionowej Ryc. 6.1. Również drobnym niedopatrzaniem jest brak klamry z gwiazdką oznaczającą istotność różnicy między grupą 1m i 9m dla jednostek FR na Ryc. 6.3. Powyżej wskazane uchybienia techniczne nie wpływają jednak na wartość merytoryczną wyników, do których omówienia przechodzę z ogromną przyjemnością. Do niewątpliwie oryginalnych osiągnięć tej pracy należy zaliczyć: (i) stwierdzenie występowania trzech typów jednostek motorycznych w badanym mięśniu we wszystkich trzech grupach zwierząt z jednoczesnym spadkiem ilości jednostek motorycznych wolnych u szczurów dorosłych w porównaniu do młodych; (ii) wykazanie, że czas skurczu oraz czas połowicznej relaksacji w skurczu pojedynczym, jak również suma tych dwóch czasów dla jednostek motorycznych szybkich są krótsze u szczurów dorosłych niż u dojrzewających i młodych; (iii) stwierdzenie przesunięcia krzywych siły od częstotliwości stymulacji jednostek motorycznych szybkich w stronę wyższych częstotliwości u dorosłych

szczurów w porównaniu do osobników dojrzewających i młodych; (iv) ukazanie obniżenia wartości stosunku siły skurczu pojedynczego do skurczu tężcowego we wszystkich typach jednostek motorycznych w grupie dorosłych w porównaniu do dojrzewających i młodych szczurów; oraz (v) wykazanie niższych wartości wskaźnika zmęczenia dla jednostek szybkich męczliwych u szczurów dorosłych niż u szczurów młodych. Równie interesujące i oryginalne są wyniki parametrów opisujących czynność bioelektryczną badanego mięśnia. Mianowicie, stwierdzono: (i) brak istotnych różnic międzygrupowych dla parametrów potencjału czynnościowego; oraz (ii) fakt, że dla jednostek motorycznych szybkich czas latencji potencjałów czynnościowych w odniesieniu do czasu pojawienia się bodźca był najdłuższy dla szczurów dorosłych (9m), a najkrótszy dla osobników dojrzewających (2m).

W dyskusji Autorka niniejszej pracy omawia w uporządkowany sposób poszczególne partie wyników i dokonuje ich logicznej interpretacji, odnosząc się jednocześnie do dostępnych danych z literatury światowej w tym zakresie. Bardzo interesującym i przekonującym jest tłumaczenie Autorki, że szybsze dojrzewanie jednostek motorycznych wolnych oraz proporcjonalnie większa ich ilość u szczurów młodych niż u dorosłych wynika z: (i) konieczności zabezpieczenia przez jednostki motoryczne wolne aktywności przeciwko sile grawitacji we wczesnym okresie rozwoju szczurów (2 tydzień rozwoju); oraz (ii) z faktu, że dla jednostek motorycznych szybkich dogodne warunki dla tworzenia większej ilości włókien mięśniowych typu II b, związane ze wzrostem poziomu hormonu tyreotropowego, następują w późniejszym okresie rozwoju. Równie interesującym i opartym na danych literaturowych rozważaniem Autorki, jest powiązanie faktu występowania wraz z dojrzewaniem niższej odporności na zmęczenie dla jednostek motorycznych typu FF, z niższą aktywnością ruchową u dorosłych niż młodych szczurów, a poprzez to rzadszym rekrutowaniem jednostek motorycznych FF u dorosłych osobników. Bardzo wartościowym dla zrozumienia dojrzewania mechanizmów sterowania siłą mięśnia są rozważania Autorki dotyczące: (i) związku pomiędzy skracaniem się czasu skurczu, a przesunięciem krzywej zależności siły od częstotliwości stymulacji w stronę wyższych częstotliwości, w jednostkach motorycznych FF oraz (ii) spadku wartości stosunku siły skurczu pojedynczego do skurczu tężcowego wszystkich jednostek motorycznych, u dorosłych szczurów. W powyższych rozważaniach Autorka wskazuje na mniejszą rolę mechanizmu częstotliwości pobudzania jednostek motorycznych przez układ nerwowy w sterowaniu siłą mięśnia u młodych osobników. Przepuszczalnie ma to również związek z faktem nie zakończenia się jeszcze procesu mielinizacji aksonów u osobników młodych, który to fakt przytacza Autorka omawiając znacznie relacji pomiędzy wynikami długości nerwu a czasem latencji potencjału czynnościowego w stosunku do bodźca elektrycznego. W końcowej części dyskusji, Doktorantka przedstawiła ograniczenia niniejszej pracy, co świadczy o rzetelności i dojrzałości naukowej Autorki niniejszego opracowania.

Wyniki badań i ich dyskusja są podsumowane prawidłowo skonstruowanymi wnioskami, stanowiącymi jasne i logiczne streszczenie osiągnięć Autorki rozprawy.

Mimo staranności w przygotowaniu niniejszego opracowania, jej Autorka nie ustrzegła się w tekście od błędów literowych, stylistycznych, przejęczyzeń lub błędów w cytowaniu i spisie literatury. Z obowiązku wynikającego z pełnionej przeze mnie funkcji recenzenta, wymieniam poniżej przykłady nielicznych, dostrzeżonych przeze mnie podczas lektury pracy uchybień tego typu.

#### Cytowane piśmiennictwo:

- cytowana w tekście (str. 15, wiersz 21) pozycja literaturowa *Bacou i wsp. (1996)* – powinno *Bacou i wsp. (1989)*;
- cytowana w tekście (str. 58, wiersz 12) pozycja literaturowa *Pogrzebna i Celichowski (2008)* nie jest ujęta w spisie piśmiennictwa;

Tekst rozprawy:

- str. 14, wiersz 9, słowo *aktywności* – powinno być *wykreślone*;
- str. 16, wiersz 11, zamiast *mięśniu* – powinno być *w mięśni*;
- str. 28, wiersz 1 i 3, zamiast *unieruchamiano* – powinno być *unieruchomiano*;
- str. 35, wiersz 3, zamiast *obliczano* – powinno być *wykreślano*;
- str. 40, wiersz 5, zamiast *charakteryzowały się krótszymi parametrami* – powinno być *były krótsze*
- str. 43, podpis ryciny 6.4. – brak adjustacji tekstu tego podpisu;
- str. 53, wiersz 3, zamiast *włókach* – powinno być *włóknach*;
- str. 57, wiersz 2, słowo *2-miesięcznych*) – powinno być *2-miesięcznych*;
- str. 57, wiersz 19, słowo *wolnych* – powinno być *wykreślone*;
- str. 59, wiersz 3, słowo *oraz* – powinno być *wykreślone*
- str. 60, wiersz 6, zamiast *młodych* – powinno być *dorosłych*;
- str. 60, wiersz 10 i 14, zamiast *wyższej* – powinno być *niższej*;
- str. 60, wiersz 11, zamiast *silaczęstotliwość* – powinno być *sila-częstotliwość*;
- str. 67, wiersz 8, zamiast *wyższa* – powinno być *niższa*.

Powyższe uchybienia nie umniejszają jednak ogromnej wartości naukowej rozprawy i są trudne do uniknięcia w pracy tego typu, a szczególności gdy poziom skomplikowania analiz i interpretacji jest tak duży jak w niniejszym opracowaniu..

Konkludując, przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Zuzanny Dobrzyńskiej jest oparta o wartościowe, oryginalne wyniki naukowe, przedstawione w dojrzały i przejrzysty sposób. Pytania badawcze są jasno określone, a wyraźnie określone cele pracy są zrealizowane przy użyciu odpowiednich metod badawczych. Wyniki omówione są w logiczny sposób i przedyskutowane w oparciu o poprawnie dobrane dane literaturowe. Praca jest prawidłowo napisana pod względem językowym jak i układu stosownego dla rozprawy o charakterze pracy doświadczalnej.

Zatem, wnoszę do Rady Wydziału Wychowania Fizycznego, Sportu i Rehabilitacji Akademii Wychowania Fizycznego im. Eugeniusza Piaseckiego w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr Zuzanny Dobrzyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

W niniejszej pracy zastosowano bardzo skomplikowane procedury badawcze, które wymagały od Autorki wykonania ogromu pracy dla zdobycia doświadczenia zarówno w przeprowadzeniu pomiarów, jak też w analizach i wieloaspektowej interpretacji danych. Prezentowana praca jest pierwszą, w której oszacowano cechy skurczu trzech typów jednostek motorycznych i potencjał czynnościowy mięśnia brzuchatego przyśrodkowego łydki szczura, co stanowi oryginalne osiągnięcie naukowe na skalę światową. Dowodem oryginalności niniejszego dzieła naukowego jest opublikowanie na bazie tych danych, przez Doktorantkę i Promotora rozprawy, w bieżącym 2016 roku, pracy w czasopiśmie z tzw. Listy Filadelfijskiej: *Dobrzynska Z, Celichowski J (2016) Changes in contractile properties and action potentials of motor units in the rat medial gastrocnemius muscle during maturation. J Physiol Pharmacol 67(1):139-50.* Dlatego też, biorąc pod uwagę bardzo wysoki poziom naukowy i oryginalność zaprezentowanych wyników badań oraz wnikliwą i dojrzałą dyskusję prowadzoną przez Autorkę niniejszej rozprawy, z przyjemnością wnioskuję do Rady Wydziału Wychowania Fizycznego, Sportu i Rehabilitacji Akademii Wychowania Fizycznego im. Eugeniusza Piaseckiego w Poznaniu o wyróżnienie pracy Pani mgr Zuzanny Dobrzyńskiej.

