

dr hab. Małgorzata Żychowska, prof. UKW  
Uniwersytet Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy  
Instytut Kultury Fizycznej, Katedra Sportu  
ul. Sportowa 2  
85-091 Bydgoszcz

Bydgoszcz, 27.07.2021

## **RECENZJA PRACY DOKTORSKIEJ**

mgr Olgi Łakomy

pt: „Suplementacja kompleksem lipidowym a status antyoksydacyjny krwi i występowanie bólu mięśniowego u biegaczy długodystansowych”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została wykonana pod kierunkiem dr hab. Ewy Sadowskiej-Krępa, prof. AWF w Katowicach, w Katedrze Nauk Fizjologiczno-Medycznych. Praca stanowi ważne i interesujące dzieło dotyczące wpływu suplementacji kompleksem lipidowym na równowagę pro/antyoksydacyjną komórek krwi i osocza, a także stan uszkodzenia błon komórkowych i tempo regeneracji. Na uwagę zasługuje fakt, że Doktorantka podjęła się badań trudnych, tak pod względem merytorycznym jak i metodycznym, a zarazem bardzo istotnych biorąc pod uwagę coraz większą ilość osób uprawiających ultramaratony i rosnącą świadomość potrzeby suplementacji kwasami omega-3, których podaż w codziennej diecie jest zazwyczaj niewystarczająca.

Biegi długie stały się modnym rodzajem aktywności fizycznej, a ich rosnąca popularność stanowi wyzwanie dla osób związanych z badaniami odpowiedzi organizmu na ekstremalny wysiłek fizyczny. Zazwyczaj amatorzy tego rodzaju wysiłków fizycznych nie są objęci monitoringiem treningu, pomocą dietetyczną czy suplementacyjną. Z kolei suplementy zawierające kompleksy lipidowe stają się coraz bardziej popularne, dlatego próba rzetelnej oceny ich wpływu na organizm osób o zwiększonej aktywności fizycznej jest bardzo cenna. Opierając się o aktualny stan wiedzy trudno określić optymalną dawkę kwasów omega-3, jaka powinna być zalecona w suplementacji osób w zależności od stopnia aktywności fizycznej. W mojej ocenie to zagadnienie będzie przedmiotem wielu dalszych badań. W literaturze przedmiotu nie ma wystarczających danych związanych z wpływem suplementacji

kompleksem lipidowym na organizm sportowca, zwłaszcza na tematykę podjętą przez mgr Olę Łakomy, a mianowicie na status antyoksydacyjny, wskaźniki stanu zapalnego, szybkość regeneracji, profil lipidowy i inne. Dlatego dobór tematyki rozprawy doktorskiej należy ocenić wysoko, uwzględniając także potrzebę posiadania szerokiej wiedzy dotyczącej funkcjonowania organizmu człowieka w warunkach odpoczynku oraz wysiłku fizycznego.

**Objętość pracy:** Praca zawiera 121 stron maszynopisu. Zawarto w niej 5 tabel w tekście oraz 5 w Aneksie, poprzedzone spisem tabel. Wyniki zaprezentowano na 9 zbiorczych rycinach. Poza główną częścią pracy, Doktorantka zamieściła także streszczenie w języku polskim i angielskim. W pracy zostały wykorzystane 233 pozycje literatury.

**Struktura pracy:** Rozprawa została podzielona na 5 rozdziałów głównych, wnioski, piśmiennictwo, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz aneks. Rozdziały główne obejmują: część przeglądową, cel pracy, materiał i metody badań, wyniki i dyskusja, w obrębie których wyszczególniono podrozdziały. Na pochwałę zasługuje układ podrozdziałów i konsekwencja w prezentowanych wynikach i ich dyskusji, zgodna z kolejnością treści w części przeglądowej.

**Ocena treści pracy:** We wprowadzeniu Doktorantka zawarła wszelkie informacje umożliwiające płynne przejście do kolejnych treści pracy. Pani mgr Olga Łakomy szeroko omówiła możliwe wartości  $VO_2$  max. osiąmane przez zawodników ultramaratonu oraz większość uwarunkowań wyniku sportowego. Na pochwałę zasługuje analiza składowych wydolności fizycznej, w tym także roli czynników genetycznych. Ostrożne podejście do interpretacji wyników badań związanych z uwarunkowaniami genetycznymi wytrzymałości, zwłaszcza dotyczące tzw. genów potencjalnie markerowych oceniam jako dużą dojrzałość Pani magister Olgi Łakomy, wynikającą z obszernej wiedzy z zakresu wydolności organizmu człowieka i jej składowych. Przygotowując pracę do druku proponowałabym jedynie zamienić niektóre określenia użyte we wprowadzeniu na bardziej fachowe (dla przykładu: „organizatorzy... podnoszą poprzeczkę” itp.),

W części przeglądowej pracy (teoretycznej) Doktorantka opisała mechanizmy adaptacji do wysiłku fizycznego (w tym adaptacji morfologicznej), zmiany czynnościowe w obrębie układu mięśniowego wywołane wysiłkiem fizycznym, ładnie i jasno wyjaśniła energetykę długotrwałej pracy mięśniowej, którą płynnie połączyła z rodzajami włókien mięśniowych i ich zaangażowaniem w poszczególne rodzaje wysiłku fizycznego. W kolejnym podrozdziale omówiła zmiany w obrębie układu krwionośnego, m.in. zwiększenie objętości osocza jako

efekt adaptacyjny, czy w erythropoezie będącej wynikiem nasilonego rozpadu erytrocytów. W mojej ocenie opis zmian mógł zostać wzbogacony o możliwość występowania w krwi niedojrzałych form krwinek (zwłaszcza retikulocytów), a także o wyjaśnienie związku tych zmian z funkcjonowaniem organizmu w warunkach wzmożonego zapotrzebowania na tlen. Biorąc pod uwagę, że taka analiza nie była celem pracy, sugestią tą można wykorzystać w trakcie przygotowania pracy do druku.

Następny podrozdział dotyczy zmęczenia organizmu. W pracy zostały omówione przyczyny, rodzaje zmęczenia zwłaszcza po wysiłku długotrwałym (hypoglikemia, zaburzenia działania pompy sodowo-potasowej, mechaniczne uszkodzenie błon komórkowych, i inne). Duży fragment podrozdziału został poświęcony opisowi DOMS, teoriom dotyczącym jego przyczyn (m.in. teorii prozapalnej, czy też mikrouszkodzeń włókien mięśniowych, teorii integracyjnej). W kontekście tematu pracy i jej założeń należy stwierdzić, że Pani mgr Olga Łakomy zachowała dobre proporcje pomiędzy poszczególnymi podrozdziałami, przybliżyła wyczerpująco te zagadnienia, które stanowiły przedmiot badań. Stąd kolejno opisała markery uszkodzenia włókien mięśniowych: troponinę, mioglobinę i kinazę keratynową.

Następny podrozdział został poświęcony stresowi oksydacyjnemu i odpowiedzi immunologicznej organizmu człowieka. Pomimo, że jest to jedno z trudniejszych zagadnień niniejszej pracy, sposób ich przedstawienia zasługuje na szczególną pochwałę. Pani mgr bardzo dobrze opisała pro i antyoksydanty oraz skutki stresu oksydacyjnego, który występuje przy zaburzeniu równowagi pro-antyoksydacyjnej. Zwróciła uwagę na adaptację wynikającą z treningu fizycznego, polegającą na zwiększeniu pojemności antyoksydacyjnej. W świetle danych literaturowych, kluczowe z punktu widzenia adaptacji jest właśnie zwiększenie pojemności antyoksydacyjnej oraz mechanizmów antyzapalnych organizmu. Opis mechanizmów odpornościowych i znaczenie cytokin przedstawiła w sposób wystarczający. Jedyna moja uwaga dotyczy opisu interleukiny 6, która w pracy doktorskiej (i słusznie) pojawia się jako interleukina o działaniu prozapalnym i antyzapalnym (str.22). W toku prezentacji wyników, ich dyskusji zmiany w jej aktywności interpretowane są jako zmiany prozapalne. Plejotropowe działanie tej interleukiny zostało już udokumentowane w literaturze, jednak niektóre pozycje wskazują, że IL6 wydzielana przez komórki mięśniowe ma działanie głównie antyzapalne. W mojej ocenie fragment ten wymaga doprecyzowania i szerszego wyjaśnienia.

Ostatni podrozdział części przeglądowej dotyczy suplementacji. Doktorantka głównie skupiła swoją uwagę na suplementacji preparatami zawierającymi różne rodzaje kwasów tłuszczowych. Zaprezentowała szeroką wiedzę dotyczącą kwasów omega-3 i omega-6,

uzasadniła przekonująco potrzebę suplementacji kwasami omega-3 w aspekcie funkcji jaką pełnią w organizmie. W tym fragmencie opisała wykorzystany w badaniach suplement: preparat naturalny – PSCO – 524 (Lyprinol) otrzymywany z nowozelandzkiego małża zielonego (*Perna canaliculus*). Wpływ wspomnianej suplementacji może być znaczący w prewencji uszkodzeń włókien mięśniowych, w poprawie wydolności układu krążenia, w zmniejszeniu ryzyka astmy oskrzelowej i niewydolności oddechowej. Doktorantka wskazuje na lukę w badaniach i doniesieniach literaturowych, dotyczącą wpływu stosowania liprynolu na obronę antyoksydacyjną, tempo regeneracji mięśni czy też na profil lipidowy (zwłaszcza kwasów tłuszczowych) we krwi. W ten sposób uzasadniła tematykę przeprowadzonych badań, których wyniki stanowią podstawę recenzowanej dysertacji doktorskiej.

Pani mgr Olga Łakomy jasno sprecyzowała główny cel pracy, który brzmi: „Głównym celem pracy jest ocena wpływu suplementacji kompleksem lipidowym PSCO-524...na zawartość kwasów tłuszczowych w krwinkach czerwonych, równowagę prooksydacyjno-antyoksydacyjną krwi, poziom markerów uszkodzenia mięśni i mediatorów stanu zapalnego, a także na poprawę stopnia regeneracji mięśni szkieletowych u biegaczy długodystansowych”. Podjęty cel pracy jest bardzo szeroki, a uzyskane zmiany stanowią wyzwanie interpretacyjne ze względu na konieczność połączenia wiedzy dotyczącej działania komórki (zmiany wewnątrzkomórkowe) jak i organizmu jako całości (zmiany wskaźników oznaczane w osoczu lub w surowicy krwi). Dalej, w odniesieniu do celu głównego zostały sformułowane 3 pytania badawcze i 3 hipotezy badań, które bezpośrednio wynikają z celu badań.

### *Material i metody badań*

Rozdział zatytułowany „Material i metody badań” został napisany bardzo dobrze i wyczerpująco. Zastosowane metody badawcze są obecnie uważane za najtrafniejsze w ocenie zmian badanych wskaźników czy parametrów i uznawane w literaturze światowej. W części dotyczącej charakterystyki badanych, Doktorantka przedstawiła jasne kryteria włączenia i wyłączenia z badań. Bardzo wysoko należy ocenić podejście do aspektów związanych z indywidualnym sposobem odżywiania się: na wstępie wykonana została analiza diety poszczególnych badanych, po czym przed oraz w trakcie eksperymentu otrzymali wskazówki żywieniowe, które umożliwiły wytrącenie wpływu czynnika związanego z różnicami w odżywianiu się na uzyskane wyniki badań. Korekty wymaga Tabela nr 3 zamieszczona na str. 32, w której błędnie przyporządkowano nazwę wierszy do prezentowanych wartości: pomylono masę ciała z jego wysokością. Ponadto warto rozważyć w opisie metody oznaczania profilu lipidowego wyraźnego wskazania, czy był on oznaczany wewnątrz czy

zewnątrzkomórkowo. Jedyna wzmianka, że dotyczył on krwinek czerwonych została zamieszczona w celu pracy. Protokół badań został przedstawiony jasno: badania wykonano 3-etapowo, w 3 etapie zastosowano losowy przydział do grup, a jedna grupa została poddana suplementacji kompleksem lipidowym. To zróżnicowanie zostało wprowadzone po wcześniejszym okresie spożywania oliwy z oliwek przez obie grupy. Zastosowany wysiłek testowy w poszczególnych etapach eksperymentu polegał na wykonaniu wysiłku biegowego ekscentrycznego, na bieżni nachylonej -16 procent przez 13 min, przy określonym tętnie. Po zakończeniu próby oznaczano próg bólu i napięcie mięśniowe. Wyznaczenie  $VO_2$  max., oraz progu mleczanowego (z analizy gazów) umożliwiło dobór odpowiedniego obciążenia w biegowym wysiłku ekscentrycznym. Wysiłek testowy badani wykonali dwukrotnie, przed i po okresie suplementacji. Krew do analiz pobierana była w spoczynku, 1h po, 12 h po i 24h po wysiłku testowym. Taki dobór punktów czasowych pozwolił na zrealizowanie celu badań. Opis dotyczący przeprowadzonych analiz biochemicznych, separacji osocza czy surowicy jest szczegółowy, tak jak jest to wymagane w pracach doktorskich. Jedyne moje pytanie dotyczy opisanego na str. 36 separacji masy erytrocytarnej: czy zastosowana procedura pozwala na uzyskanie jedynie erytrocytów, czy też komórek krwi (w tym krwinek białych)?

Analiza statystyczna wyników wykonana została w sposób właściwy, umożliwiający odpowiedź na pytania badawcze. Ze względu na ilość wykonanych pomiarów w różnych punktach czasowych wyliczenie ANOVY dwuczynnikowej (ANOVA 2-way) i interpretacja jej wyników mogłaby dostarczyć jeszcze większych możliwości interpretacyjnych, w tym dotyczących poprawy możliwości adaptacyjnych do wysiłku fizycznego czy też przesunięcia się w czasie zmian poszczególnych wskaźników, co jest istotne w przypadku analizy zmian adaptacyjnych. Sugestię tą pozostawiam do rozważenia przed przygotowaniem artykułów naukowych do druku.

### *Wyniki badań*

Doktorantka rozpoczęła analizę wyników od przedstawienia wpływu suplementacji kompleksem lipidowym na indeks kwasów tłuszczowych. Istotne zmiany wystąpiły jedynie w indeksie kwasów tłuszczowych TRANS oraz w stosunku kwasu arachidowego do eikozapentaenowego.

Suplementacja kompleksem lipidowym wpłynęła pozytywnie (choć nie we wszystkich punktach czasowych różnice były istotne) na możliwości obrony antyoksydacyjnej. Aktywność enzymów krwinkowych: CAT i SOD były wyższe w grupie suplementowanej w

wybranych punktach czasowych, podczas gdy stężenie produktów peroksydacji lipidów (MDA) było istotnie niższe w porównaniu z grupą kontrolną. Analizując uzyskane wyniki badań widać wyraźną tendencję do zwiększenia się MDA w grupie placebo, jak i zmianę odpowiedzi w poszczególnych punktach czasowych, jednak dokładna interpretacja wyników byłaby możliwa po przeliczeniu ANOVA-dwuczynnikowej. Podobna uwaga dotyczy markerów uszkodzenia błon komórkowych. Kolejno Pani mgr przedstawiła wyniki zmian TNF- $\alpha$  oraz hsIL6. Nie stwierdziła istotnego wpływu zastosowanej suplementacji na wskaźniki stanu zapalnego.

Na zakończenie sekcji wyniki, Pani mgr Olga Łakomy przedstawiła wpływ suplementacji kompleksem lipidowym na stopień regeneracji mięśni w spoczynku oraz po zakończeniu wysiłku biegowego, w badaniu 2 i 3. Oceniła próg bólu w mięśniu czworogłowym oraz dwugłowego lewej i prawej kończyny dolnej, przed oraz po okresie suplementacji. Wyniki tych badań są dobrze zaprezentowane, ciekawe, aczkolwiek trudne do interpretacji. Moja drobna uwaga dotyczy zapisu liczbowego w tabelach, zastosowano angielski zapis liczb, tj. zamiast przecinków wstawiono kropki, co oczywiście nie wpływa na wartość merytoryczną pracy.

## **Dyskusja**

Pani mgr Olga Łakomy równie dobrze napisała rozdział dyskusja. Poza przybliżeniem czytelnikowi podstawowych wiadomości z zakresu prezentowanego tematu, Doktorantka przedstawiła najnowsze dane z literatury z zakresu suplementacji preparatami lipidowymi i ich wpływ na organizm człowieka, w tym na stres oksydacyjny, reakcje pro i antyzapalne czy adaptację do treningu. Biorąc pod uwagę, że jej własne wyniki badań w znacznym stopniu nie potwierdziły zakładanej hipotezy badawczej, a dane literaturowe dotyczące podjętej tematyki są ograniczone, przeprowadzenie odpowiedniej dyskusji i interpretacja uzyskanych wyników nie była zdaniem łatwym. Przykładowo, trudno zinterpretować dlaczego po okresie suplementacji oliwą z oliwek JNKT nie uległo zmianie, pomimo zastosowania zrównoważonej diety u wszystkich badanych. Ze względu na stosunkowo nową tematykę podjętą w badaniach, różne okresy stosowania suplementacji, różne dawki podawanych suplementów lipidowych trudno określić, co stanowi przyczynę zróżnicowanych doniesień w literaturze przedmiotu. Zgadzam się z autorką, że zastosowanie pomiarów indeksu kwasów tłuszczowych we krwi zastosowane w niniejszej pracy może stanowić punkt wyjściowy do dalszych badań, w ustaleniu długości i dawki suplementu w celu uzyskania pożądanego efektu.

Równie ciekawa jest interpretacja wyników oznaczeń równowagi pro-antyoksydacyjnej, w tym aktywności enzymów antyoksydacyjnych, świadczące o dojrzałości naukowej Doktorantki. Ten fragment dyskusji należy ocenić wysoko. Co ciekawe, uzyskane wyniki poprawy w progu bólowym i obniżenia napięcia mięśniowego wskazują na pozytywny wpływ suplementacji kompleksem lipidowym w tym zakresie, pomimo, że nie odnotowano istotnych zmian w równowadze pro-antyoksydacyjnej, wskaźnikach uszkodzeń błon komórkowych, czy TNF. Wpływ zastosowanej suplementacji na podniesienie progu bólowego, obniżenie napięcia mięśni czy DOMS jest ciekawym spostrzeżeniem aplikacyjnym Pani mgr Olgi Łakomy.

Na podstawie przeprowadzonych badań Doktorantka wyciągnęła 4 wnioski, które stanowią odpowiedź na postawione pytania badawcze. Cel badań został osiągnięty. Całość pracy doktorskiej została napisana dobrym językiem naukowym. W toku czytania zauważalne są drobne uchybienia, polegające m.in. na pozostawieniu kilku urwanych zdań (np. jedno z nich występuje na str. 64). Oceniając jednak ilość tych niedociągnięć należy uznać, że nie wpływają one na ocenę recenzowanej pracy.

W podsumowaniu oceny pracy doktorskiej mgr Olgi Łakomy stwierdzam, że zaprezentowane wyniki badań oraz wnioski mają znaczenie poznawcze oraz aplikacyjne. Uzyskane wyniki badań, zastosowane metody badawcze pozwoliły na osiągnięcie nowatorskiego celu pracy. Praca Pani Olgi Łakomy zasługuje na opinię bardzo dobrej. W związku z powyższym uważam, że recenzowana dysertacja doktorska spełnia wszystkie kryteria stawiane rozprawom na stopień naukowy doktora określone w Ustawie z dn. 14.03.2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytułach w zakresie sztuki wraz z późniejszymi zmianami. W związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej AWF w Katowicach o dopuszczenie Pani mgr Olgi Łakomy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. Małgorzata Żychowska, profesor UKW

