

Dr hab. prof. AWF Ewa Jówko  
Akademia Wychowania Fizycznego Józefa Piłsudskiego w Warszawie  
Wydział Wychowania Fizycznego i Zdrowia w Białej Podlaskiej  
Katedra Nauk Przyrodniczych

## Ocena

Rozprawy doktorskiej mgr Olgi Łakomy

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

### *Tematyka badawcza- znaczenie i oryginalność podejmowanego tematu*

Bieg ultramaratoński jest rodzajem terenowego biegu długodystansowego o charakterze wysiłku wytrzymałościowego, z dodatkową komponentą ekscentrycznej pracy mięśni. Jak wiadomo, znaczne obciążenia jakim są poddawani biegacze mogą wywoływać szereg zmian biochemicznych zakłócających równowagę prooksydacyjno-antyoksydacyjną w komórkach, prowadząc do uszkodzenia komórek mięśni szkieletowych, nasilenia stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego. Dodatkowym elementem nasilającym powyższe zmiany są mechaniczne zaburzenia mikrostruktury włókien mięśniowych wywołane przez ekscentryczną pracę mięśni. Omówione powyżej zmiany mogą wpływać na odczuwanie zmęczenia i przyczyniać się do występowania opóźnionej bolesności mięśni. W celu łagodzenia tych skutków i przyspieszenia regeneracji powysiłkowej, powszechne jest stosowanie przez zawodników trenujących biegi długodystansowe suplementów diety wspomagających proces treningowy i regenerację. Należą do nich, między innymi, preparaty zawierające wielonienasycone kwasy tłuszczowe omega-3 o działaniu przeciwzapalnym. Zasadność ich podawania może wynikać z faktu, iż w przypadku diet zachodnich często stwierdza się zaburzenie proporcji kwasów omega-3, pochodzących głównie z tłustych ryb morskich, do kwasów omega-6, których głównym źródłem są oleje roślinne (proporcje te wynoszą często 1:10 - 1:20, zamiast rekomendowanych 1:1 - 1:5). Tymczasem nadmiar kwasów tłuszczowych omega-6 w stosunku do omega-3 może skutkować nasileniem procesów prozapalnych w organizmie, co w efekcie zwiększa ryzyko występowania chorób sercowo-naczyniowych, a u sportowców opóźnia regenerację powysiłkową. W literaturze naukowej istnieje wiele prac dotyczących podawania preparatów z kwasami omega-3, głównie w postaci skoncentrowanego oleju rybnego bogatego w kwas eikozapentaenowy (EPA) oraz kwas dokozaheksaenowy (DHA). Niestety prace te, w zdecydowanej większości dotyczą badania efektywności suplementacji kwasami omega-3 u osób nietrenujących lub uprawiających sport amatorsko. W badaniach opisanych w przedłożonej mi do recenzji pracy doktorskiej, preparat lipidowy podawano w grupie zawodników trenujących biegi długodystansowe i startujących w ultramaratonach. Co ważne, w badaniach tych zastosowano unikalną formą preparatu zawierającego kompleks lipidowy o nazwie Lyprinol®, pozyskiwany z nowozelandzkiego małża zielonego na drodze

opatentowanego procesu ekstrakcji ciekłym dwutlenkiem węgla (PCSO-524®). Ekstrakt ten zawiera, oprócz dwóch podstawowych kwasów omega-3: EPA i DHA, także inne kwasy tłuszczowe omega-3, związki lipidowe czy karotenoidy. Ze względu na unikalny skład, preparatowi przypisuje się prozdrowotne właściwości wynikające z hamowania aktywności enzymów biorących udział w powstawaniu procesu zapalnego. Niewiele jest jednak prac oceniających wpływ podawania kompleksu lipidowego Lyprinol na wskaźniki biochemiczne związane ze stanem zapalnym, stresem oksydacyjnym, czy uszkodzeniem mięśni w warunkach wysiłkowych u sportowców wyczynowych. Z uwagi na powyższe, wybór tematu rozprawy doktorskiej Pani mgr Olgi Łakomy uważam za w pełni uzasadniony. Podjęta przez doktorantkę tematyka badawcza jest bardzo aktualna, z niewątpliwym znaczeniem poznawczym i aplikacyjnym.

### ***Ocena strony formalnej pracy***

Recenzowana praca ma układ typowy dla rozpraw doktorskich. Jest on prawidłowy również w odniesieniu do struktury podziału treści. Rozprawa obejmuje 121 stron, podzielona została na rozdziały i tematycznie uzasadnione podrozdziały, które stanowią logiczną całość. Zamieszczone w pracy treści są zgodne z tematem określonym w tytule. W głównej części pracy znajduje się 5 tabel i 21 rycin, które są umieszczone w odpowiednich miejscach tekstu i w większości zawierają poprawne podpisy (poza ryciną 4.7, która przedstawia próg bólu mięśnia dwugłowego, a nie jak jest podpisane, mięśnia czworogłowego uda). W pracy Autorka wykorzystwała bogate piśmiennictwo (w sumie 233 aktualne pozycje literatury, w większości anglojęzyczne) cytowane zgodnie z osiągnięciami w tej dziedzinie. Doktorantka słusznie umieściła na początku pracy wykaz najczęściej używanych w pracy skrótów, umożliwiając czytającemu płynne zapoznanie się z treścią. Na końcu pracy umieszczono streszczenie w języku polskim i angielskim oraz aneks z tabelami, w których przedstawiono wartości liczbowe ocenianych parametrów, przedstawionych w pracy w postaci graficznej (tj. parametrów równowagi prooksydacyjno-antyoksydacyjnej, uszkodzenia mięśni, stanu zapalnego oraz progów bólu i napięcia mięśniowego mięśni czworogłowego i dwugłowego uda, jak też dane dotyczące indywidualnego spożycia składników pokarmowych).

Z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę na występujące w pracy nieprawidłowości dotyczące pisowni wyrazów: „ponadto” oraz „wskutek”, które piszemy razem, a nie rozdzielnie („ponad to”- strona 20, 55; „w skutek”- strony: 24, 64, 66, 67, 72). Uwagi te dotyczą również pisowni z „nie”: z czasownikami piszemy rozdzielnie (jest napisane łącznie: „niebyło” – strona 84), zaś z przymiotnikami piszemy łącznie (w pracy jest napisane rozdzielnie: „nie istotny” – strona 75). Z kolei słowo „wysoko kwalifikowani” piszemy rozdzielnie (a nie razem: strona 7). Wspomniane nieprawidłowości oraz występujące w pracy błędy edytorskie wskazują na niedostateczną końcową korektę pracy.

### ***Ocena merytoryczna pracy***

We „**Wstępie**” (części przeglądowej) Autorka wprowadza czytelnika w zagadnienia dotyczące podjętego problemu, umiejętnie dobierając treści zawarte w tym rozdziale, co niewątpliwie świadczy o ogromnej wiedzy i znajomości literatury przedmiotu. Autorka powołuje się na dotychczasowe osiągnięcia w tym zakresie i przytacza aktualną literaturę.

Zagadnienia omawiane w kolejnych podrozdziałach dotyczą czynników wpływających na zmiany adaptacyjne tkanki mięśniowej do wysiłku wytrzymałościowego. Kolejno omówione zostały przyczyny zmęczenia w biegach długodystansowych oraz przedstawiono różne hipotezy dotyczące pojawienia się opóźnionej bolesności mięśni (DOMS). W dalszej części opisano systemy antyoksydacyjne ustroju, przyczyny zaburzenia równowagi prooksydacyjno-antyoksydacyjnej podczas biegów ultramaratońskich oraz konsekwencje zaburzenia tej równowagi związane z uszkodzeniem włókien mięśniowych i aktywacją układu immunologicznego. Następnie Autorka płynnie przechodzi do omówienia roli suplementacji w profilaktyce zmęczenia i bólu mięśniowego, skupiając uwagę na kwasach omega-3 i Lyprinolu.

**Celem pracy** była ocena wpływu suplementacji preparatem lipidowym Lyprinol PCSO-524® na zawartość kwasów tłuszczowych w krwinkach czerwonych, równowagę prooksydacyjno-antyoksydacyjną krwi, poziom markerów uszkodzenia mięśni i mediatorów stanu zapalnego we krwi, a także na wskaźniki regeneracji mięśni szkieletowych u biegaczy długodystansowych.

Cel pracy został poparty trzema prawidłowo sformułowanymi pytaniami badawczymi. Przedstawiono też trzy hipotezy badawcze, z których pierwsza jest nieprecyzyjna, dotyczy bowiem oczekiwanego podwyższenia poziomu kwasów tłuszczowych w krwinkach czerwonych w wyniku podawania Lyprinolu, ale nie wskazano jakich kwasów tłuszczowych. Przyjęty układ eksperymentalny uwzględniał przyjmowanie kapsułek zawierających oliwę z oliwek (źródła kwasów tłuszczowych) w obu badanych grupach: grupa suplementowana preparatem Lyprinol (SUPL) przyjmowała dziennie 400 mg ekstraktu lipidowego PCSO-524® oraz 800 mg oliwy z oliwek, zaś grupa placebo (PL) przyjmowała samą oliwę z oliwek w dziennej dawce 1200 mg. Tymczasem w pracy oznaczano w krwinkach następujące parametry dotyczące indeksu kwasów tłuszczowych: stosunek kwasów tłuszczowych nasyconych do jednonienasyconych (NKT/JNKT) oraz indeks kwasów tłuszczowych trans (ITRANS). Oba te parametry powinny zostać obniżone, i to nie tylko w grupie suplementowanej, ale też w grupie placebo, a to za sprawą oliwy z oliwek będącej źródłem jednonienasyconego kwasu oleinowego. Trzecim ocenianym indeksem był stosunek potencjalnie prozapalnego kwasu arachidonowego AA (z rodziny kwasów omega-6) do przeciwzapalnego kwasu eikozapentaenowego EPA (kwasu omega-3 będącego składnikiem suplementu Lyprinol), który to indeks powinien zostać obniżony w efekcie podawania Lyprinolu. Jednak najbardziej trafnym parametrem, w mojej ocenie, byłby indeks omega-3 (kwasów EPA i DHA jako głównych składników kompleksu lipidowego Lyprinol) przedstawiający procentową zawartość kwasów omega-3 w całkowitej ilości kwasów tłuszczowych, który rzeczywiście powinien się podnieść w efekcie suplementacji Lyprinolem.

Odnosząc się do **metodologicznej części pracy**, odpowiada ona aktualnym przesłankom w zakresie pisania prac naukowych. W bardzo syntetyczny i szczegółowy sposób opisano badaną grupę, organizację badań oraz zastosowane w pracy techniki i metody badawcze, które w większości są trafnie dobrane. Ogólnie koncepcja przeprowadzonych badań jest przemyślana i starannie zaplanowana. Dodatkowo przebieg badań został przedstawiony graficznie, co ułatwia czytelnikowi zrozumienie kolejności ich wykonywania.

Badaniami objęto 24 zawodników trenujących biegi długodystansowe i startujących w biegach ultramaratońskich, będących w okresie przygotowawczym rocznego cyklu treningowego. Kryteria włączenia do badań oraz wyłączenia z badań zostały dobrze dobrane i szczegółowo opisane. W trakcie badań zawodnicy nie brali udziału w żadnych zawodach sportowych. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej. Badanych poddano ocenie sposobu żywienia metodą wywiadu kwestionariuszowego, z wykorzystaniem programu dietetycznego Dietus, oznaczono skład tkankowy ciała metodą bioimpedancji elektrycznej oraz parametry wydolnościowe, między innymi pułap tlenowy ( $VO_2max$ ), w teście progresywnym na bieżni ruchomej. Następnie badani wykonali 30-minutowy test biegowy o charakterze pracy ekscentrycznej (przy nachyleniu bieżni minus 16%) z intensywnością 70%  $VO_2max$ . Test ten był wykonany dwukrotnie: przed i po trzech tygodniach przyjmowania suplementu Lyprinol (grupa SUPL) albo placebo (grupa PL). Z kolei przed każdym z tych testów, jak i po ich zakończeniu (bezpośrednio po, po 1 godzinie oraz po 24 godzinach) pobierano krew do oznaczeń parametrów biochemicznych, jak też oceniano ból mięśni (wyznaczając uciskowy próg bólu przy użyciu algometry) i napięcie mięśni przy użyciu miotonometru (na podstawie analizy powierzchniowego napięcia tkanek, określonego jako sztywność- rezystencja i wyliczenia tzw. obszaru pod krzywą- AUC).

Mając na uwadze obowiązek recenzenta muszę zwrócić uwagę na niejasności w części metodologicznej pracy.

W opisie przebiegu badań (ryc. 2), w podanych punktach czasowych, w których oznaczano parametry biochemiczne i oceniano ból i napięcie mięśniowe, widnieje pomiar 12 h po wysiłku, podczas gdy na rycinach przedstawiających wyniki badań oraz w opisie wyników nie uwzględniono tego punktu czasowego.

W tabeli 3 przedstawiającej wskaźniki antropometryczne i wydolnościowe badanych brakuje jednostek przy wartościach tętna i poboru tlenu.

W opisie składników Lyprinolu podano niewłaściwe nazwy kwasów wielonienasyconych (PUFA): przykładowo „kwas 5, 9, 12, 15- oktodecatetrakoenowy”- zapewne chodzi o kwas 5, 9, 12, 15- oktadecatetraenowy.

W podrozdziale 3.9 dotyczącym suplementacji, mylnie podano skład kapsułki zawierającej ekstrakt lipidowy (100 g oliwy i 50 g PCSO-524<sup>®</sup>) oraz kapsułki placebo (150 g oliwy z oliwek)- z podanych dziennych dawek preparatów wynika, że ilości te dotyczą miligramów a nie gramów.

**Wyniki** badań przedstawiono głównie w formie graficznej, a jak wspomniano wcześniej wartości liczbowe badanych parametrów zostały przedstawione w tabelach zamieszczonych w aneksie. Taki sposób prezentacji uzyskanych wyników oceniam pozytywnie, gdyż jest bardzo czytelny. Klarowny jest też sposób opisywania wyników w tekście, chociaż Doktorantka nie uniknęła drobnych potknięć opisując zmiany poszczególnych parametrów. W przypadku ostatniego zdania dotyczącego aktywności dehydrogenazy mleczanowej (LDH), opisane zmiany nie mają odzwierciedlenia w ryc. 4.4. Jedyna istotna zmiana tego parametru, w stosunku do obserwowanej w 1 godzinie restytucji powysiłkowej, dotyczy aktywności LDH w 24 h restytucji w grupie PL, a nie jak wskazano w grupie SUPL, opisana zmiana dotyczyła

tylko badania 2 (nie jak napisano 1 i 2), i była znamienne niższa (a wpisano „wyższe niższe”) od aktywności po 1 godzinie.

Merytorycznym kryterium oceny pracy doktorskiej jest umiejętność dokonania krytycznej oceny uzyskanych wyników badań na tle aktualnego dorobku naukowego. W rozdziale **Dyskusja**, Autorka odnosi wyniki swoich badań do rezultatów innych autorów. Jest to najobszerniejsza część pracy, w której Doktorantka wskazuje na podobieństwa i różnice wyników badań własnych i innych autorów. W tym rozdziale ujawnia się naukowa dociekliwość Autorki świadcząca o znajomości poruszanej problematyki badań. Jednak w wielu miejscach brakuje krytycznej oceny uzyskanych wyników badań własnych, opartej na wykonanych analizach statystycznych, co ma też odzwierciedlenie we wnioskach. Dotyczy to chociażby niespodziewanego istotnego wzrostu indeksu TRANS w grupie PL po suplementacji. Autorka wyjaśnia, że czynnikiem podwyższającym ten wskaźnik jest spożycie tłuszczów trans, zaś badani byli objęci reżimem dietetycznym przez cały czas trwania doświadczenia. Jednak z informacji podanych w podrozdziale 3.1 (charakterystyka badanych) nie wynika jasno, jak też reżim był weryfikowany. Z opisu można wnioskować, że sposób żywienia oceniano przed przystąpieniem do badań (dane w tabeli 2 w podrozdziale 3.1 oraz tabela 1 w aneksie), a zawodnicy zostali poinstruowani aby otrzymane wskazówki dietetyczne stosować przez trzy tygodnie przed badaniami i w trakcie realizacji projektu. Nie ma jednak danych dotyczących oceny sposobu żywienia w trakcie trwania badań. Nie jest zatem wykluczone, że przyczyną tych zmian mogło być niestosowanie się części badanych do tych zaleceń i spożywanie przetworzonych produktów bogatych w tłuszcze trans.

Inną kwestią jest niedostateczne wyjaśnienie przyczyn obniżenia indeksu AA/EPA po suplementacji, szczególnie w grupie PL. Chociaż wskazano, że zmiana ta jest większa w grupie SUPL niż PL, a efekt ten przypisano głównie obecności EPA w przyjmowanym przez grupę SUPL preparacie Lyprinol (wniosek nr 1), należy jednak nadmienić, że obniżenie tego indeksu dotyczyło obu badanych grup, a różnice międzygrupowe nie były istotne statystycznie.

Omawiając wyniki dotyczące statusu antyoksydacyjnego, Autorka niepotrzebnie rozpisuje się na temat zmian, które nie były istotne statystycznie, jak w przypadku aktywności peroksydazy glutationowej (GPx). Z kolei w omówieniu zmian aktywności innego enzymu obrony antyoksydacyjnej: dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), wskazano na korzystny wpływ suplementacji Lyprinolem, na podstawie powysiłkowego wzrostu aktywności SOD w grupie SUPL w badaniu 2 (po suplementacji). Jednak istotny wzrost powysiłkowej aktywności SOD w badaniu 2 dotyczył nie tylko grupy SUPL, ale też grupy PL. Dodatkowo, w badaniu 1 (czyli przed suplementacją), w grupie SUPL odnotowano istotnie wyższą niż w grupie PL aktywność SOD w 24 godzinie restytucji, co wskazuje na udział innych czynników (poza suplementacją) w odpowiedzi antyoksydacyjnej. W związku z powyższym, stwierdzenie we wniosku nr 2 o korzystnym wpływie suplementacji kompleksem lipidowym (Lyprinol) na aktywność SOD nie ma jednoznacznego potwierdzenia w uzyskanych wynikach. Należy tutaj nadmienić, że Autorka zaobserwowała powysiłkowy wzrost aktywności SOD w krwinkach czerwonych, które nie posiadają jąder komórkowych, a więc bez możliwości zwiększonej ekspresji genu kodującego SOD i syntezy białka enzymatycznego w adaptacji do wysiłku fizycznego lub pod wpływem suplementacji. Zatem powysiłkowy wzrost aktywności SOD

(istotny w obu grupach) może być też wskaźnikiem zwiększonej produkcji wolnych rodników tlenowych, a konkretnie rodnika ponadtlenkowego, będącego substratem SOD. Potwierdzają to zmiany w stężeniu we krwi wskaźnika potencjału antyoksydacyjnego nieenzymatycznego (zredukowanego glutationu, GSH), jak też wskaźnika peroksydacji lipidów (MDA). W badaniu 2, w porównaniu do badania 1, w obu grupach można stwierdzić istotne obniżenie poziomu GSH, jak też wzrost poziomu MDA. Zmiany te mogą wskazywać na nasilenie stresu oksydacyjnego w efekcie trzech tygodni badania (możliwe, że wywołane intensywnymi treningami). Co prawda w badaniu 2 zaobserwowano istotne różnice pomiędzy grupami w poziomie MDA (niższy w grupie SUPL vs PL, zarówno w spoczynku jak i po wysiłku), które mogłoby wskazywać na potencjalne korzyści suplementacji kompleksem lipidowym Lyprinol, jednak podobne istotne różnice międzygrupowe dotyczą również wartości spoczynkowych przed suplementacją (a więc na wstępie badania).

W pracy brakuje próby wyjaśnienia przyczyny opisanych powyżej różnic pomiędzy grupami, już w badaniu wstępnym, przed przystąpieniem do suplementacji, a jak wiadomo te wstępne różnice mogą wpływać na kierunek i wielkość zmian omawianych parametrów po suplementacji. Uwagi te dotyczą również poziomu progu bólowego i napięcia mięśniowego. Autorka wskazuje we wniosku nr 3 na korzystny wpływ suplementu (Lyprinol) na poziom odczuwanego bólu i napięcia mięśni przy zastosowanych narzędziach pomiarowych. Potwierdzeniem mają być zaobserwowane w grupie SUPL po suplementacji rosnące, w stosunku do wcześniejszych pomiarów, wartości progu bólowego w 24 godzinie restytucji. Jednak nie można wykluczyć, że na opisany kierunek zmian wpłynęły różnice międzygrupowe na wstępie. Generalnie grupa SUPL charakteryzowała się niższym w porównaniu do grupy PL progiem bólowym, przy czym istotne różnice pomiędzy grupami odnotowano w przypadku wartości spoczynkowych mięśnia czworogłowego w badaniu 2 (ryc. 4.6), zaś w badaniu 1 - wartości spoczynkowych mięśnia dwugłowego uda (ryc. 4.7) oraz wartości powysiłkowych mięśnia czworogłowego uda (4.6). Podobnie w przypadku napięcia mięśniowego, o ile kierunek zmian w badaniu 2 też może wskazywać na korzystny efekt suplementacji Lyprinolem, jednak w tym przypadku również zaobserwowano różnice międzygrupowe na wstępie (w badaniu 1). Powyższe kwestie powinny być wzięte pod uwagę w formułowaniu wniosku nr 3.

Wskazanych niejasności w interpretacji wyników można było uniknąć, przy wykazaniu istotnego efektu głównego suplementacji preparatem Lyprinol. Ponadto, w metodach zadeklarowano ocenę wielkości wpływu czynnika eksperymentalnego (suplementu) wykorzystując statystyki „r Cohena oraz współczynnika konkordancji W Kendalla”, a wartości wskaźnika r umieszczono w tabelach w aneksie, jednak w opisie wyników i w dyskusji Autorka w ogóle nie odnosi się do tych wskaźników.

Z drugiej strony, jak wiadomo trudności dotyczące oceny efektywności podawania suplementów zawierających kwasy omega-3 w grupie sportowców wyczynowych mogą wynikać z wyższego poziomu adaptacji wysiłkowej sportowców w porównaniu do osób nietreningujących. Niewykluczone też, że sportowcy mogą wymagać wyższych dawek kwasów EPA/DHA i dłuższego okresu suplementacji, na co wskazuje Doktorantka w dyskusji. Zgadzam się również z Autorką odnośnie ostatniego wniosku, dotyczącego potrzeby

przeprowadzenia kolejnych badań rozszerzonych o pomiary w 48 i 72 godzinie restytucji, celem dokładniejszego zbadania wpływu suplementacji kompleksem lipidowym Lyprinol na przebieg regeneracji powysiłkowej.

### ***Podsumowanie***

Przytoczone powyżej uwagi krytyczne nie umniejszają wartości merytorycznej recenzowanej dysertacji doktorskiej Pani mgr Olgi Łakomy. Mimo pewnych uwag, stronę merytoryczną uwzględniającą zarówno aktualność podjętego tematu, cel naukowy pracy, materiał badań, zastosowane metody badawcze czy opracowanie wyników oceniam pozytywnie. Praca wnosi wartości poznawcze do nauk o kulturze fizycznej, z uwzględnieniem obszaru sportu kwalifikowanego.

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Olgi Łakomy, pt. ”Suplementacja kompleksem lipidowym a status antyoksydacyjny krwi i występowanie bólu mięśniowego u biegaczy długodystansowych” spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim (Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki). Wnoszę zatem do Wysokiego Senatu Akademii Wychowania Fizycznego im. Jerzego Kukuczki w Katowicach o dopuszczenie Pani mgr Olgi Łakomy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biała Podlaska, 08.10.2021