

Akademia Wychowania Fizycznego w Krakowie

Wydział Rehabilitacji Ruchowej

Instytut Nauk Podstawowych

Zakład Chemii i Biochemii

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Sebastiana Bańkowskiego pt: „Wpływ suplementacji kurkumina na wybrane wskaźniki biochemiczne we krwi biegaczy długodystansowych”, sporządzona na potrzeby postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki o kulturze fizycznej

1. Aspekt formalny

Recenzja została sporządzona w związku z uchwałą nr AR001-026-IV/2023 Senatu Akademii Wychowania Fizycznego w Katowicach z dnia 25.04.2023 roku, działającej na podstawie art. 190 ust. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2022 r, poz. 574). Niniejsza recenzja została wykonana w oparciu o egzemplarz rozprawy doktorskiej przesłany w formie tradycyjnej.

2. Układ pracy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska liczy 74 strony nie uwzględniając załączników dołączonych do pracy. Rozprawa składa się z dwóch elementów: opisu projektu naukowego w języku polskim oraz artykułu oryginalnego w języku angielskim. Początek dysertacji doktorskiej stanowią: spis treści, wykaz najczęściej stosowanych skrótów oraz część teoretyczna, zatytułowana przez Doktoranta: częścią przeglądową. W części tej Pan mgr. przedstawia przegląd literatury dotyczący: fizjologiczno-biochemicznych aspektów wysiłku w biegach długodystansowych; znaczenie równowagi prooksydacyjno-antyoksydacyjnej w wysiłku o charakterze wytrzymałościowym z dodatkowym opisem wybranych wskaźników

tej równowagi; kolejno charakteryzuje kurkuminę pod względem fitochemicznym oraz nakreśla jej wpływ na szereg procesów fizjologicznych ustroju; kolejne podrozdziały zawierają zwięzły przegląd informacji dotyczących: uszkodzeń mięśni szkieletowych związanych z wysiłkiem fizycznym; oraz wpływ wysiłku fizycznego na układ odpornościowy, wybrany czynnik neurotroficzny (BDNF), wybraną sirtuinę (SIRT3) oraz elementy morfotyczne krwi.

W kolejnym rozdziale Pan mgr przedstawił cel swojej pracy, materiał i metody badań, uzyskane wyniki, które następnie zostały przedyskutowane w rozdziale liczącym 14 stron. Doktorant wskazał ograniczenia dotyczące interpretacji uzyskanych wyników, następnie wyciągnął wnioski oraz przedstawił bibliografię, która posłużyła do przygotowania niniejszej dysertacji.

Zastosowany układ pracy jest przejrzysty, czytelny, pozwala na swobodne zrozumienie przedstawionych w pracy materiałów i treści. Na zakończenie pracy, Doktorant zamieścił artykuł oryginalny, który został opublikowany w czasopiśmie Redox Report (ISSN online 1743-2928) oraz uchwałę Uczelnianej Komisji Bioetycznej ds. Badań Naukowych przy Akademii Wychowania Fizycznego im. Jerzego Kukuczki w Katowicach dotyczącą pozytywnej opinii na temat zgłoszonego przez Doktoranta wniosku o zgodę na przeprowadzenie badań.

3. Wartość naukowa i merytoryczna ocenianej rozprawy doktorskiej

Promotorem rozprawy mgr Sebastiana Bańkowskiego była prof. dr hab. Ewa Sadowska-Krępa, nie wskazano promotora pomocniczego.

Podjęte przez Pana mgr badania zostały opublikowane w 1 oryginalnym artykule naukowym w renomowanym czasopiśmie z grupy Q1 w kategoriach: biochemia, genetyka i biologia molekularna – biochemia; biochemia kliniczna; fizjologia oraz biochemia medyczna. Doktorant przedstawia dysertację z opisem całego projektu, łącznie z wynikami, które do tej pory jeszcze nie zostały opublikowane. Punktacja opublikowanego artykułu oryginalnego, wynosi 5,696 IF (70 pkt MNiSW). We wskazanym artykule, Doktorant jest pierwszym autorem. Wskazano, że jego wkład obejmował: zaprojektowanie i przeprowadzenie badań, analizę uzyskanych wyników oraz przegląd literatury. Autorem korespondencyjnym była Promotor pracy, Pani Profesor Ewa Sadowska-Krępa. Przytoczona punktacja artykułu naukowego wskazuje na wysoką wartość publikacji stanowiącej jeden z dwóch elementów

podstawy ubiegania się Pana mgr Sebastiana Bańkowskiego o stopień doktora nauk o kulturze fizycznej.

Na uwagę zasługuje bardzo szerokie spojrzenie na wpływ suplementacji kurkumina w ściśle określonej grupie sportowców. Doktorant wskazuje wpływ suplementacji na zmiany fizjologiczne i biochemiczne w tym równowagę prooksydacyjno-antyoksydacyjną, profil markerów oceniających stopień uszkodzenia włókien mięśniowych, jak i osoczowe stężenie BDNF i wybranej sirtuiny. Takie omówienie wpływu suplementacji wymagało pogłębionego ale także szerokiego przeglądu literatury naukowej, dlatego nie dziwi, że Doktorant odwołał się ostatecznie do 248 pozycji literaturowych. Wśród wskazanych pozycji bibliograficznych, 67% stanowiły prace opublikowane nie później jak 10 lat wstecz.

Merytoryczna ocena rozprawy doktorskiej opartej o dysertację oraz opublikowany, oryginalny artykuł naukowy wydany w czasopiśmie znajdującym się w Q1, jest częściowo ułatwiona ze względu na proces niezależnego recenzowania tekstu artykułu oryginalnego na etapie wydawniczym. Dodatkowo zbiorcze opracowanie przeprowadzonych badań i przedstawienie w postaci spójnej dysertacji wymagało od Doktoranta bardzo dobrej znajomości tematyki badawczej oraz sprawnego posługiwania się warsztatem pisarskim.

Pierwszy bieg maratoński jako impreza lekkoatletyczna odbył się w ramach igrzysk olimpijskich w 1896 roku w Atenach. Współcześnie biegi długodystansowe stały się światowym fenomenem, i przyciągają profesjonalnych sportowców i amatorów. W tej drugiej grupie znajdują się głównie osoby w średnim wieku, co doskonale wykorzystał Doktorant wybierając kryteria włączenia do swojego projektu naukowego. Jednym z głównych motywów amatorskich biegaczy długodystansowych jest oczekiwanie, że ćwiczenia wytrzymałościowe zapewnią korzystne efekty prozdrowotne. Jednocześnie, w celu poprawy wyników sportowych stosuje się szereg form suplementacji, począwszy od węglowodanowych i białkowych, poprzez suplementację witamin, po składniki specjalne i modyfikacje diety np. poprzez wprowadzenie większej ilości związków polifenolowych, o szerokim, korzystnym wpływie na organizm człowieka. Wybrany przez Pana mgr związek, kurkumina jest naturalnym związkiem polifenolowym występującym w korzeniu *Curcuma longa* L. z rodziny imbirowatych. Związek ten ma długą tradycję stosowania w medycynie naturalnej a współcześnie był badany jako środek przeciwdrobnoustrojowy, przeciwzapalny, przeciwnowotworowy i ograniczający zmiany związane ze starzeniem się. Ograniczenia dotyczące farmakokinetyki tego związku wpływają na możliwości zastosowania terapeutycznego. Aby zniwelować to ograniczenie,

Doktorant, w swoich badaniach wykorzystał preparat, w którym połączono kurkuminę z piperyną, znanym inhibitorem glukuronidacji w wątrobie i jelitach. Takie połączenie pozwala na zwiększenie biodostępności kurkuminy, co zostało udowodnione tak w modelu zwierzęcym jak i u zdrowych ochotników.

Doktorant przedstawił cel swojej pracy, którym była ocena wpływu 6-tygodniowej suplementacji kurkuminą w dawce 2g/dobę na morfologię krwi, wskaźniki równowagi prooksydacyjno-antyoksydacyjnej, stanu zapalnego, uszkodzeń mięśni szkieletowych i poziom BDNF w surowicy krwi u amatorskich biegaczy długodystansowych w okresie przygotowawczym cyklu treningowego. Dla nadania klarowności postawił także 5 pytań badawczych:

1. Czy suplementacja kurkuminą wpłynie na wskaźniki równowagi prooksydacyjno-antyoksydacyjnej i stężenie SIRT3 u biegaczy wykonujących test wysiłkowy z udziałem skurczów ekscentrycznych?
2. Czy zastosowana suplementacja wpłynie na stężenie wybranych cytokin prozapalnych i białka C-reaktywnego u badanych mężczyzn wykonujących test wysiłkowy?
3. Czy suplementacja kurkuminą wpłynie na ograniczoną ucieczkę enzymów komórkowych do krwiobiegu po teście wysiłkowym?
4. Czy zastosowana suplementacja wpłynie na stężenie BDNF w surowicy krwi u badanych biegaczy wykonujących test wysiłkowy?
5. Czy suplementacja wpłynie na wydolność tlenową badanych mężczyzn w okresie przygotowawczym cyklu treningowego?

Po wcześniejszej analizie dostępnego piśmiennictwa, Doktorant przedstawił następujące hipotezy badawcze:

1. Sześciotygodniowa suplementacja kurkuminą w dawce 2g/dobę zwiększy antyoksydacyjny efekt treningu fizycznego w okresie przygotowawczym oraz zmniejszy stan zapalny u biegaczy długodystansowych wykonujących test wysiłkowy z udziałem skurczów ekscentrycznych.
2. Zastosowana suplementacja ograniczy uszkodzenia mięśni szkieletowych indukowane testem wysiłkowym.
3. Suplementacja kurkuminą wpłynie na wzrost stężenia BDNF w grupie badanych mężczyzn.

4. Zastosowana suplementacja wpłynie na wydolność tlenową (VO_{2max}) uczestników badań.

Materiał badań został opisany przez Doktoranta w sposób pedantyczny. Przedstawiono charakterystykę grupy badanej, konstrukcję badań, opis testów wysiłkowych oraz szczegółowe metody wykorzystane do określenia punktów końcowych. W tym miejscu należy pogratulować Doktorantowi oraz całemu zespołowi badawczemu udanej rekrutacji do projektu. Skompletowanie grupy względnie jednorodnej, bez suplementacji i stosowania farmakoterapii wśród sportowców amatorów w średnim wieku jest trudnym wyzwaniem. Oceniając zastosowane metody i narzędzia badawcze, uwagę zwraca szeroki zakres kontroli biochemicznej, co wymagało drobiazgowej, interdyscyplinarnej wiedzy, by wyniki tych badań prawidłowo zinterpretować i przedyskutować.

Oszacowania składu ciała dokonano 2 krotnie, przed i po okresie 6-tygodniowej suplementacji wykorzystując zjawisko bioimpedancji. Dwukrotnie wykonano test wysiłkowy: test biegowy o stopniowo narastającym obciążeniu na bieżni ruchomej. W czasie testu szybkość biegu wzrastała, co 3 min o 2km/h, aż do osiągnięcia prędkości biegu 14 km/h, a następnie zwiększano kąt nachylenia bieżni do podłoża o $2,5^{\circ}$, a test prowadzono aż do odmowy. Podczas biegu dokonywano stałego pomiaru poboru tlenu oraz monitorowano częstość skurczów serca. Dla każdego z dwóch testów wysiłkowych, krew do oznaczeń biochemicznych pobierano 3 krotnie tj. w spoczynku, w 3 minucie po zakończeniu wysiłku i po 1 godzinie restytucji powysiłkowej. Każdy z uczestników miał zatem 6 krotnie pobieraną krew. W uzyskanym materiale biologicznym oznaczono markery pogrupowane przez Doktoranta jako:

- Wskaźniki stresu oksydacyjnego:
 - całkowita zdolność oksydacyjna (TOS) w osoczu krwi;
 - stężenie produktów peroksydacji lipidów z kwasem tiobarbiturowym (MDA) w osoczu krwi;
 - stężenie 8-OhdG metodą immunoenzymatyczną w surowicy krwi.
- Wskaźniki uszkodzeń mięśni szkieletowych:
 - aktywność kinazy kreatynowej (CK);
 - aktywność dehydrogenazy mleczanowej (LDH);
 - stężenie mioglobiny (MB);
 - aktywność aminotransferazy alaninowej (ALT);
 - aktywność aminotransferazy asparaginianowej (AST).

- Wskaźniki statusu antyoksydacyjnego i stężenie SIRT3:
 - aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) w hemolizatach erytrocytów;
 - aktywność katalazy (CAT) w hemolizatach krwinek czerwonych;
 - aktywność peroksydazy glutationowej (GPx) w hemolizatach erytrocytów;
 - stężenie zredukowanego glutationu (GSH);
 - stężenie kwasu moczowego (KM) w osoczu krwi;
 - całkowita zdolność antyoksydacyjna (TAS) osocza krwi;
 - stężenie SIRT3 w surowicy krwi .
- Wskaźniki stanu zapalnego:
 - stężenie TNF α w surowicy krwi;
 - stężenie IL-1 β w surowicy krwi;
 - stężenie IL-6 w surowicy krwi;
 - stężenie CRP oznaczano w surowicy krwi.
- Stężenie neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgowego (BDNF).

Należy podkreślić, że dla każdego z badanych markerów biochemicznych Pan mgr wskazał czułość metody, błąd wewnątrzoznaczeniowy, międzyoznaczeniowy oraz zakres wartości referencyjnych. Wybierając testy statystyczne do analizy uzyskanych wyników, Doktorant posłużył się nie tylko badaniem istotności ale oceniał także wielkość efektu, co stanowi ważny wgląd w praktyczne znaczenie uzyskanych danych.

Wyniki zostały przedstawione szczegółowo z wykorzystaniem rycin. Każda z nich została poprawnie opisana i zachowuje zasadę samo-opisywalności pozwalając na niezależną interpretację wykresu po wycięciu go z manuskryptu. Rozdział wyniki został podzielony na sekcje, podobnie jak kolejny rozdział: Dyskusja. Ważnym, choć trudnym rozdziałem jest rozdział: ograniczenia w badaniach. Doktorant wskazał w nim, które elementy jego projektu naukowego stanowią swoiste ograniczenia w interpretacji uzyskanych wyników. Za ten element pracy chciałabym szczególnie docenić Pana mgr. Takie krytyczne spojrzenie na uzyskane dane wymaga szerokiego spojrzenia i dojrzałości naukowej. Podobne warunki musiały być spełnione dla prawidłowego wyciągnięcia wniosków z przeprowadzonych badań. Doktorant wskazał, że:

1. Pomimo statystycznie istotnego wzrostu SIRT3 po 6-tygodniowym stosowaniu kurkuminy w dawce 2g/dobę nie potwierdzono hipotezy badawczej, że badany

- suplement istotnie wzmacnia antyoksydacyjny efekt treningu fizycznego w okresie przygotowawczym oraz poprawia wydolność tlenową u biegaczy długodystansowych.
2. Suplementacja kurkumina wpływa nieznacznie na obniżenie stanu zapalnego indukowanego wysiłkiem fizycznym u biegaczy długodystansowych.
 3. Przyjmowanie kurkuminy nie wpłynęło znacząco na ograniczenie uszkodzeń mięśni szkieletowych.
 4. Suplementacja kurkumina nie wpływa znamienne na wzrost stężenia BDNF w surowicy krwi w spoczynku u badanych mężczyzn.
 5. Uzyskane wyniki wskazują na potrzebę rozszerzenia badań związanych z suplementacją kurkumina w wyższych dawkach w celu potwierdzenia ergogenicznych korzyści tego suplementu oraz potrzeby jego stosowania w okresie przygotowawczym cyklu treningowego u biegaczy długodystansowych.

Takie krytyczne spojrzenie na swoje wyniki i pokazanie, że mimo postawionych hipotez opartych na przeprowadzonej wcześniej analizie literatury naukowej, wyniki nie potwierdziły domniemanych właściwości kurkuminy, pokazują dojrzałość naukową Doktoranta, który nie dążył do nadinterpretacji danych, dodatkowo potrafił pokazać ewentualne przyczyny braku uzyskania pożądaných efektów.

3. Poprawność redakcyjna rozprawy

Rozprawa doktorska Pana mgr Sebastiana Bańkowskiego składa się z części opisującej projekt naukowy Doktoranta w języku polskim oraz z artykułu oryginalnego w języku angielskim. W swojej ocenie odniosę się jedynie do opisu przedstawionego w języku polskim. Znaczna większość tekstu napisana jest poprawnym językiem naukowym. Kolejność poszczególnych rozdziałów została ułożona w sposób logiczny i konsekwentny. W tym aspekcie doktorant zasługuje na szczególną pochwałę. Kandydat nie uniknął jednak błędów literowych czy stylistycznych i w tym zakresie praca mogłaby być bardziej dopracowana. Doktorant w wielu miejscach pracy zastosował potoczne słownictwo, dla przykładu używał terminu „wzrostu poziomu” lub „wzrost poziomu stężenia”. Dla ryciny nr 3 brakuje wyjaśnień stosowanych w niej skrótów. W tekście natomiast pojawiają się wielokrotne wyjaśnienia stosowanych już wcześniej skrótów, czasami niehomogenne. Nie ma także jednolitości w zapisie określeń anglojęzycznych (zapis kursywą czy standardową czcionką). Szata graficzna pracy, poza tymi drobnymi potknięciami, nie budzi żadnych zastrzeżeń.

4. Uwagi krytyczne

Pomimo wysokiej oceny pracy doktorskiej mgr Sebastiana Bańkowskiego z recenzenckiego obowiązku zamieszczę także pewne uwagi krytyczne.

Wstęp: poprawy wymagają następujące elementy: *„Miedź jest centrum katalitycznym, natomiast cynk tworzy strukturę SOD.”*; *„Dialdehyd malonowy (MDA, ang. malondialdehyde) jest głównym metabolitem kwasu arachidonowego i wykorzystywany jest jako biomarker stresu oksydacyjnego. Powstaje podczas peroksydacji wielonienasyconych kwasów tłuszczowych i metabolizmu kwasu arachidonowego”*; *„8-hydroksy-2-deoksyguanazylna”*; *„Biodostępność kurkuminy może być również poprawić poprzez dodanie piperyny, nanocząstek, liposomów lub fosfolipidów”*

Materiał i metody: czy porównano grupę suplementowaną i grupę placebo między sobą? W tabeli 1 nie podano wyników analizy statystycznej wartości wyjściowych dotyczących cech fizjologicznych i somatycznych uczestników projektu. Nie wskazano także metody randomizacji. Jako kryteria wykluczenia wskazano: „przyjmowanie jakichkolwiek leków” oraz „przyjmowanie NLPZ” nie wskazując rozwinięcia skrótu oraz nie wskazując dlaczego właśnie ta grupa leków została dodatkowo podkreślona, mimo, że zawiera się już w pierwszym warunku: jakiegokolwiek leki. Pierwsze zdanie podrozdziału: Placebo wydaje się dotyczyć suplementowanego składnika aktywnego a nie produktu placebo.

Rozdziały: Wyniki i Dyskusja zostały podzielone na podrozdziały, jednak kolejność opisywanych w nich wskaźników nie jest tożsama. Utrzymanie stałej kolejności nakreślonej już pytaniami badawczymi dodałaby klarowności pracy.

Te drobne nieprecyzyjności, wymienione powyżej dotyczą jedynie opisu w języku polskim. Bardzo proszę Pana mgr Sebastiana Bańkowskiego o doprecyzowanie następujących kwestii:

1. Kurkumina, jak inne antyoksydanty może w pewnych warunkach wykazywać cechy związku prooksydacyjnego. Czy w Pana badaniach mogło dojść do takiej sytuacji? Jakie warunki należy zachować aby takiego działania nie wywołała suplementacja kurkuminy u sportowców amatorów?
2. Jaką metodę randomizacji zastosowano w niniejszym projekcie?

3. Doktorant pisze: „*BDNF jest szeroko rozpowszechnioną neurotrofiną w układzie nerwowym a ćwiczenia wytrzymałościowe są jednym z czynników powodujących jej uwalnianie. Można wyróżnić dwie aktywne formy BDNF: formę prekursorową (pro-BDNF) oraz „dojrzałą” (mBDNF). W związku z tym w naszych badaniach zdecydowaliśmy się na ocenę tych dwóch wskaźników w surowicy krwi u biegaczy długodystansowych.*” Proszę o wyjaśnienie, czy przedstawione wyniki dotyczą BDNF czy łącznie BDNF i pro-BDNF?

5. Ocena końcowa

Podsumowując, przedstawiona do recenzji dysertacja wraz z opublikowanym artykułem oryginalnym, stanowiące podstawę ubiegania się o stopień doktora nauk o kulturze fizycznej oceniam bardzo wysoko. Podjęty w niej temat jest istotny, dobór grupy bardzo ciekawy, a tego typu badania przyczyniają się do odpowiedzi na pytanie: jakie są determinanty poprawy predyspozycji do wysiłku fizycznego u mężczyzn w średnim wieku oraz w jaki sposób można modyfikować te determinanty odpowiednio dobraną suplementacją. Praca doktorska mgr Sebastiana Bańkowskiego w pełni wpisuje się w nurt badań związanych z naukami o kulturze fizycznej. Wyliczone uwagi krytyczne mają na celu jedynie zwiększyć uważność dotyczącą używania fachowego słownictwa w języku polskim, chociaż należy zaznaczyć, że współczesny naukowiec zajmujący się tematyką suplementacji w wysiłku fizycznym musi przede wszystkim znakomicie operować językiem angielskim. Wartość punktowa opublikowanego artykułu jest wysoka, dodatkowo pragnę zwrócić uwagę na znaczący udział Doktoranta w przygotowaniu opublikowanego tekstu, co zdecydowanie wskazuje na osiągnięcie dobrego warsztatu naukowego. W związku z powyższym stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska **Pana mgr Sebastiana Bańkowskiego spełnia** wszystkie warunki określone w art. 180 ust. 1 i 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2022 poz. 574). Dlatego wnioskuję do Senatu Akademii Wychowania Fizycznego im. Jerzego Kukuczki w Katowicach o dopuszczenie Kandydata do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Zakładu Chemii i Biochemii
Anna Piotrowska
dr hab. Anna Piotrowska
profesor AWF