

Recenzja pracy doktorskiej lek. mgr biologii Moniki Buraczewskiej
wykonanej w Zakładzie Fizjologii Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. M. Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk

ANALIZA ZMIAN WYBRANYCH PARAMETRÓW ECHOKARDIOGRAFICZNYCH I
WSKAŹNIKÓW BIOCHEMICZNYCH ORAZ ZALEŻNOŚCI MIĘDZY NIMI PODCZAS BIEGU
DŁUGODYSTANSOWEGO U BIEGACZY AMATORÓW

Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Naukową
Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. M. Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk

Intensywny i długotrwały wysiłek dynamiczny, jak trening maratończyka (biegi ciągłe) czy udział w maratonie lub ultramaratonie, angażuje dużą masę mięśniową, tym samym prowadzi do istotnego zwiększenia zużycia tlenu oraz wzrostu rzutu serca, objętości wyrzutowej i częstości pracy serca oraz skurczowego i średniego ciśnienia tętniczego z obniżeniem ciśnienia rozkurczowego i oporu obwodowego. Natomiast intensywny trening statyczny, jak elementy siły ogólnej i dynamicznej w treningu biegacza długodystansowego, w niewielkim stopniu zwiększa zużycie tlenu, rzut i częstość pracy serca, nie wpływa na objętość wyrzutową, ale istotnie podnosi ciśnienie tętnicze skurczowe i rozkurczowe. Oznacza to, że obciążenie serca podczas wysiłku dynamicznego ma charakter objętościowy, a podczas wysiłku statycznego głównie ciśnieniowy [Szyszko A i Sianiawski A. W: Kardiologia sportowa w praktyce klinicznej. Red. Braksator W i Mamcarz A. Wyd. PZWL 2016]. Następstwem uprawiania dyscyplin wytrzymałościowych, jak biegi długodystansowe, są zmiany wielkości jam serca i grubości ich ścian w obrazie echokardiograficznym oraz zmiany czynności skurczowej i rozkurczowej odbiegających od przyjętych wartości referencyjnych. Uprawnia to do rozpoznania sportowej przebudowy serca. Według Szyszko i Sianiawskiego [wyżej wym. cyt.] sportowa przebudowa serca jest wynikiem interakcji między predyspozycjami genetycznymi a określonym rodzajem wysiłku oraz wynikiem wpływu dodatkowych czynników, jak wiek, płeć, wysokość i masa ciała, niedozwolone formy dopingu i schorzenia współistniejące. Powiększenie i przerost lewej komory w okresie obniżenia intensywności i czasu trwania treningów lub całkowitego zaprzestania treningów ulega zmniejszeniu i nie skutkuje upośledzeniem wydolności serca u sportowców. W przeciwieństwie do kardiomiopatii przerostowej oraz nieprawidłowej czynności skurczowej i rozkurczowej prawej lub obu komór, które są najczęstszą przyczyną nagłych zgonów sportowców.

Sportowa przebudowa serca wiąże się z rozwojem zapalenia i stresu oksydacyjnego w obszarze mięśnia sercowego (*inflammatory cardiomyopathy*), co jest niezbędne w regeneracji serca i jego adaptacji do wysiłku fizycznego. Z drugiej strony może być przyczyną niewydolności serca i rozwoju zespołu

przetrenowania (*overtraining syndrome*), gdy intensywny trening nie jest równoważony odpowiednim czasem wypoczynku pozwalającym na rozwój odpowiedzi przeciwzapalnej i antyoksydacyjnej. Zapalenie mięśnia sercowego wywołane powtarzanym wyczerpującym wysiłkiem (trwającym powyżej 2 godzin) z krótkimi okresami wypoczynku (poniżej 6 godzin) jest przyczyną 5-20% nagłych zgonów sportowców ogółem, w przypadku biegaczy długodystansowych od 1 do 2 na 100 tys. startujących mężczyzn w maratonach [Harris KM. et al. Am J Cardiol 2021 doi: 10.1016/j.amjcard.2020.12.028, Waite O. et al. Phys Sportmed 2016 doi: 10.1080/00913847.2016.1135036]. Monitorowanie równowagi pro- i przeciwzapalnej obejmuje m.in. pomiar stężenia kortyzolu i miostatyny, cytokin prozapalnych IL-1 β , IL-6, IL-18 i TNF α , przeciwzapalnych głównie IL-1ra i IL-10. Utrzymujący się wysoki poziom wymienionych mediatorów zapalenia zaburza anaboliczny sygnał i hamuje procesy regeneracji tkanek. W ostatnich latach zwrócono szczególną uwagę na rozwój zapalenia mięśnia sercowego u osób podejmujących aktywność fizyczną na poziomie zawodniczym, jak start w maratonie lub ultramaratonie [Compagnucci P. et al. Medicina (Kaunas) 2021 doi: 10.3390/medicina57030277].

Praca doktorska przedstawiona do recenzji została zrealizowana w Zakładzie Fizjologii Stosowanej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk – jednym z wiodących ośrodków prowadzących badania oceny reakcji neurohormonalnych, hemodynamicznych, metabolicznych i termoregulacyjnych na bodźce fizjologiczne.

Praca ma objętość 160 stron i posiada typowy układ stosowany w rozprawach doktorskich z podziałem na: wstęp, cel pracy, materiał i metody, wyniki badań, wnioski oraz streszczenie w wersji polskiej i angielskiej. W tekście pracy znajduje się 12 tabel i 11 rycin. Piśmiennictwo obejmuje 290 pozycji. **Brak numeru uchwały Komisji Bioetycznej** przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym, która wyraziła zgodę na przeprowadzenie badań. Badania wykonana w ramach grantu otrzymanego w drodze konkursu - z Narodowego Centrum Nauki (Nr N N404 204739).

W streszczeniu autorka przedstawia wyniki badań w sposób opisowy, bez podania jakichkolwiek wartości pomiarów, jedynie liczba uczestników (maraton $n=12$, ultramaraton $n=9$) i średni czas $\pm$ odchylenie standardowe przebiegnięcia maratonu i ultramaratonu.

We wstępie/wprowadzeniu Autorka krótko prezentuje zakres działań medycyny sportowej, następnie opisuje korzyści zdrowotne wynikające z regularnej aktywności fizycznej, ale także ewentualne zagrożenia spowodowane nadmiernym obciążeniem wysiłkiem fizycznym przekraczające możliwości adaptacyjne układów i narządów w tym także układu sercowo-naczyniowego. Obszernie opisuje wykorzystanie echokardiografii w diagnostyce serca oraz potencjalne wskaźniki biochemiczne i fizjologiczne (reaktywne formy tlenu i azotu, cytokiny pro- i przeciwzapalne, peptyd natriuretyczny typu B, białka adhezyjne, białka wiążące wapń i in.) pozwalające monitorować wpływ wysiłku na pracę serca oraz przejściowe zaburzenia funkcji rozkurczowej lub skurczowej i rozkurczowej komór serca (*cardiac fatigue*), cytując około 100 różnych

badan. **We wstępie pracy brakuje wskazań i przeciwwskazań do udziału w sporcie, na podstawie diagnostycznych badań kardiologicznych, inaczej kardiologicznej kwalifikacji do sportu – proszę o uzupełnienie podczas obrony.**

W rozdziale „Cel pracy” Autorka wskazuje cele nadrzędne/główne, czyli ocena zależności między wybranymi parametrami echokardiograficznymi a składowymi profilu zapalnego u uczestników maratonu i ultramaratonu. Cel główny został rozbudowany w formie siedmiu celów cząstkowych zredagowanych wg schematu „Zbadanie zależności”. Oszczędna i nietypowa forma redagowania celu badań powtórzona w sekcji 2. Innowacyjność rozprawy. Słowo „innovacyjny” odnosi się do wdrożenia nowego lub znacząco udoskonalonego produktu lub procesu. **Proszę wyjaśnić zatem – na czym polega innowacyjność przeprowadzonych badań.**

W rozdziale „Materiał i metody”, Autorka opisuje proces rekrutacji do badań 32 biegaczy - zgodnie z przyjętymi kryteriami kwalifikacji - uczestników Maratonu Cracovia i Maratonu Warszawskiego w 2012 oraz 100-km ultramaratonu Bieg Siedmiu Dolin w Krynicy Zdroju w 2012 roku. Ostatecznie projekt zrealizowano z udziałem 21 biegaczy (maratończycy $n=12$, ultramaratończycy $n=9$), którzy ukończyli wymienione dystanse. **Proszę o doprecyzowanie w trakcie obrony kryteriów włączenia i wykluczenia z badań oraz uzupełnienie informacji nt. liczby kobiet i mężczyzn. Z użytej formy - zawodnicy, uczestnicy - można się jedynie domyślić, że to byli mężczyźni. Proszę także o podanie rodzaju kwestionariusza zdrowia wypełnionego przez osoby rekrutowane. Czy kwestionariusz obejmował pytania dotyczące przyjmowanych leków lub suplementów żywieniowych w okresie dwóch tygodni przed startem i/lub w okresie restytucji – po biegu. Zaskakujący jest odległy termin badań 2012 rok – proszę także o wyjaśnienie, czy w 2012 roku wymienione imprezy sportowe były objęte kontrolą antydopingową.** Badania wykonano trzykrotnie (dzień przed rozpoczęciem biegu, bezpośrednio po zakończeniu biegu oraz po min. 90 minutach odpoczynku) i objęły: badanie echokardiograficzne (konwencjonalna echokardiografia, konwencjonalna echokardiografia dopplerowska, pulsacyjny doppler tkankowy), pomiar ciśnienia tętniczego krwi i tętna oraz pobranie krwi. Analiza biochemiczna została wykonana za pomocą testów immunoenzymatycznych i chemiluminescencyjnych o wysokiej czułości. Zastosowana przez Autorkę metodyka badań echokardiograficznych i biochemicznych jest standardowa, procedury zostały jasno opisane. Analizę statystyczną wykonano za pomocą pakietu statystycznego Statistica 9.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). **Proszę o wyjaśnienie, czy sprawdzono założenia do zastosowania testów parametrycznych lub nieparametrycznych - ocena normalności rozkładów.** Do testowania istotności pomiędzy terminami badań (przed biegiem, po biegu i po wypoczynku) zastosowano test Wilcoxona, natomiast w porównaniu maratończyków i ultramaratończyków zastosowano test nieparametryczny U Manna-Whitney’a. **Czy w każdym przypadku – wyniki pomiarów nie wykazywały rozkładu normalnego? Z jakiego powodu wykonano analizę rang Spearmana (ρ ?) i/lub analizę Pearsona (r ?)? Czy dokonano analizy wielkości**

próby (*sample size calculation*)? Proszę o wyjaśnienie - w trakcie obrony pracy doktorskiej - zasadności stosowanych narzędzi statystycznych.

Rozdział „Wyniki badań” obejmuje opis zmian wskaźników antropometrycznych, biochemicznych i badania echokardiograficznego przed i po maratonie lub ultramaratonie, z zaznaczeniem statystycznie istotnych różnic pomiędzy analizowanymi terminami badań i grupami sportowców. Szczegółowe wyniki przedstawiono w 14 tabelach i na 11 rycinach, za pomocą średniej arytmetycznej i odchylenia standardowego ($x \pm SD$) oraz wartości minimum i maksimum. Wykazano statystycznie istotne różnice wartości wskaźników hemodynamicznych u 12 maratończyków i 9 ultramaratończyków, w porównaniu do wartości wyjściowych - przed biegiem (tab.2 i tab.7). W przypadku zmian stężenia mediatorów zapalenia (TNF α , IL-6, IL-10, IL-18, NT-proBNP) - wykazano istotne różnice w porównaniu do wartości wyjściowych oraz w pomiarach w okresie wypoczynku w obu grupach biegaczy (tab.3 i tab.8). Kierunek zmian stężenia był porównywalny, jednak widoczne są różnice w profilu cytokin - maraton vs. ultramaraton. Szczególnie duże różnice dotyczą N-końcowego fragmentu prohormonu BNP (NT-proBNP), którego stężenie u ultramaratończyków jest 4-krotnie wyższe niż u maratończyków ($p=0.002$), co potwierdza wyższe obciążenie serca pracą/wysiłkiem podczas 100-km biegu. W przypadku maratonu wartości NT-proBNP, przypuszczam, wzrosły nieistotnie powyżej wartości referencyjnych w przeciwieństwie do ultramaratonu – wartości 3-4 krotnie wyższe w stosunku do wartości referencyjnych (mężczyźni <95 pg/mL, kobiety <178 pg/mL). **Jednak zaskakująca jest sekwencja zmian w obu grupach biegaczy – przy nadal utrzymującym się wysokim stężeniu prozapalnych cytokin (TNF α , IL-6, IL-18) nastąpiło obniżenie przeciwzapalnej cytokiny IL-10. Czy planując czas pobierania materiału – krew - uwzględniono sekwencję odpowiedzi zapalnej na uszkodzenie tkanek wywołane długotrwałym wysiłkiem fizycznym? Na jakiej podstawie Autorka wprowadziła skalę zmian stężenia mediatorów zapalenia – typu „w bardzo dużym stopniu, w niewielkim stopniu, umiarkowanie” (sekcja 6.1.1.)?** W przypadku konwencjonalnej echokardiografii - w obu grupach biegaczy - nie stwierdzono istotnych zmian objętości frakcji wyrzutowej lewej komory, amplitudy ruchu pierścienia mitralnego i ruchu pierścienia trójdzielnego, za wyjątkiem frakcji wyrzutowej lewej komory u maratończyków (tab.4 i tab.9). Analiza wartości konwencjonalnych parametrów dopplerowskich funkcji rozkurczowej lewej komory pokazała brak zmian w czasie rozkurczu izowolumetrycznego lewej komory, natomiast pokazała istotne obniżenie maksymalnej prędkości wczesnej fali napływu przez zastawkę mitralną i czasu deceleracji fali po zakończeniu biegu przez maratończyków i ultramaratończyków (tab.5 i tab.10). Analiza wartości parametrów pulsacyjnego dopplera tkankowego funkcji skurczowej i rozkurczowej lewej i prawej komory u maratończyków pokazała istotne statystycznie różnice szczególnie w pomiarach prędkości wczesnorozkurczowej części przegrodowej i części bocznej pierścienia mitralnego, prędkości końcowo-rozkurczowej części przegrodowej pierścienia mitralnego oraz prędkości wczesnorozkurczowej pierścienia trójdzielnego po biegu w porównaniu do wartości wyjściowych (tab.6), podczas gdy u ultramaratończyków nie wykazano statystycznie istotnych różnic w analizie zmian wartości parametrów pulsacyjnego dopplera tkankowego po biegu w porównaniu do wartości wyjściowych (tab.11). Analiza rang Spearmana ujawniła istotne zależności – w spoczynku/przed biegiem -

między stężeniem mediatorów zapalenia a zmianami parametrów echokardiograficznych w grupie maratończyków (ryc.2A-D) i ultramaratończyków (ryc.6A-D). **Dlaczego z analizy korelacji wykluczono pomiary bezpośrednio po biegu oraz po okresie wypoczynku? Proszę o wyjaśnienie w trakcie obrony doktorskiej zasadność wprowadzenia delty w opracowaniu danych pomiarowych.**

W dyskusji Autorka konfrontuje wyniki badań z danymi z piśmiennictwa, utrzymując podział i kolejność omówienia wskaźników zapalnych i parametrów echokardiograficznych - zastosowane w pozostałej części dysertacji doktorskiej, podrozdziały dyskusji zamyka krótkim podsumowaniem. Koncentruje się na interpretacji uzyskanych wyników badań poprzez porównanie maratończyków i ultramaratończyków, nie pomijając żadnego z badanych wskaźników zapalnych i parametrów echokardiograficznych. Niezwykle wartościowe jest podkreślenie przez Autorkę, że „...u uczestników maratonu wystąpiły zaburzenia funkcji rozkurczowej obu komór, które polegały na zaburzeniach relaksacji ... u uczestników 100-kilometrowego biegu wystąpiły natomiast zaburzenia funkcji rozkurczowej tylko lewej komory, objawiające się jedynie zmianami parametrów napływu mitralnego.” „...normalizacja funkcji rozkurczowej lewej komory po wysiłku jest sprawą bardzo indywidualną i trudno jednoznacznie ocenić, od czego w głównej mierze zależy”. Autorka wyjaśnia ograniczenia badania, z którymi spotyka się wielu naukowców realizujących projekty badawcze/diagnostyczne z udziałem sportowców, jak np. nieukończenie zawodów/biegu.

Wnioski są jednoznacznie powiązane z wynikami badań, zredagowane w formie podsumowania. Ocena adaptacji do wysiłku opiera się na jednoczesnej analizie zmian wielu elementów równowagi na poziomie tkanek, narządów i/lub całego organizmu. **Proszę zatem - w trakcie obrony pracy doktorskiej - o sformułowanie wniosku opierającego się na zmianach równowagi pro-i przeciwzapalnej w relacji do zmian wskaźników echokardiograficznych oraz przydatności diagnostycznej analizowanych kardiomiokin w monitorowaniu zapalenia mięśnia sercowego u sportowców reprezentujących dyscypliny wytrzymałościowe czy ultrawytrzymałościowe (praktyczne implikacje badań).**

Przedstawiona mi do recenzji praca jest wykonana zgodnie z protokołem badania obserwacyjnego bez grupy kontrolnej, opiera się na prawidłowych założeniach i prawidłowo dobranych metodach badań mediatorów zapalenia i echokardiografii. **Z uznaniem należy odnotować, że projekt jest jednym z niewielu, a być może jedynym realizowanym z udziałem polskich biegaczy, u których wykonano tak szeroki panel badań echokardiograficznych finansowanym ze środków uzyskanych w drodze konkursu z Narodowego Centrum Nauki (N N404 204739).**

Pomimo ogólnie pozytywnej oceny pracy, z obowiązku recenzenta, pozwalam sobie wspomnieć o kilku aspektach, których uwzględnienie zwiększyłoby wartość przedstawionej dysertacji:

- Wyjaśnienie we wstępie pracy pojęcia kardiomiokiny i zestawienie (w formie tabeli lub schematu) profilu cząsteczek klasyfikowanych jako kardiomiokiny, ze wskazaniem ich działania plejotropowego – charakterystyczne dla cząsteczek endokrynnych.

- Włączenie do pracy standardowych wskaźników zapalenia, jak białko C-reaktywne, liczba neutrofili, monocytów, limfocytów i płytek krwi oraz przedstawienie stosunku wymienionych elementów morfotycznych krwi w formie: *NLR neutrophil count/lymphocyte count*, *SII systemic inflammation index* lub *SIRI systemic inflammation response index*.
- Zintegrowana analiza porównawcza maratończyków i ultramaratończyków w sekcji „Wyniki badań”, z wykorzystaniem odpowiednich narzędzi statystycznych, jak ocena ryzyka (hazard ratio HR) rozwoju niewydolności serca u badanych sportowców.
- Styl pracy – Autorka interpretuje wyniki badań w sekcji – dyskusja – ustawiając siebie w pierwszej osobie. Język naukowy cechuje stosowanie form bezosobowych, strony biernej, czasu przeszłego i form przypuszczających. Projekt realizował zespół naukowców, zatem zdecydowanie powinna być użyta forma typu – wykazano, zaobserwowano itp. – to nie deprecjonuje udziału Doktorantki w projekcie, ale nie pomija udziału zespołu badawczego.

Reasumując, wyniki badań nie budzą wątpliwości, że udział w maratonie lub ultramaratonie stanowi duże obciążenie dla prawidłowej pracy serca oraz inicjuje stan zapalny o niezdefiniowanej sekwencji zdarzeń prowadzących do zaburzenia sygnału anabolicznego i regeneracji mięśnia sercowego, co wskazuje na konieczność włączenia tej grupy sportowców do stałej obserwacji i diagnostyki kardiologicznej.

Praca lek. mgr biologii Moniki Buraczewskiej spełnia warunki stawiane pracom doktorskim określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.). Wnoszę zatem do Wysockiej Rady Naukowej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



.....
 dr hab. Agnieszka Zembroń-Łacny, prof. UZ
 Katedra Fizjologii Stosowanej i Klinicznej
 Collegium Medicum Uniwersytet Zielonogórski