

dr hab. Agnieszka Zembroń-Lacny, prof. UZ

Wydział Lekarski i Nauk o Zdrowiu

Uniwersytet Zielonogórski

### **Recenzja pracy doktorskiej**

**mgr Bartosza Trawińskiego**

„Fizjologiczne i biochemiczne aspekty niedotlenienia kończyny górnej  
poddanej wysiłkowi fizycznemu”

Niedotlenienie mięśni szkieletowych lub mięśnia sercowego, stałe (choroba tętnic obwodowych, choroba niedokrwienna serca) lub okresowe (wysiłek fizyczny) jest efektem zaburzenia równowagi między zapotrzebowaniem komórek na tlen i energię a możliwościami ich dostawy. Nierównowaga ta szczególnie wyraźnie zaznacza się w czasie wysiłku fizycznego; szybciej i silniej kurczące się mięśnie potrzebują więcej tlenu. W przypadku osób z chorobami naczyniowymi, zwężone tętnice nie są w stanie sprostać takiemu zapotrzebowaniu. W tej sytuacji dochodzi do niedotlenienia mięśni szkieletowych i/lub mięśnia sercowego manifestujące się bólem niedokrwiennym należącym do najbardziej opornych na leczenie objawów w medycynie paliatywnej [Foley TR i wsp. Curr Treat Options Cardiovasc Med. 2016; Spitz-Meyer A i Żylicz Z. Medycyna Paliatywna 2010].

Ból niedokrwienny pochodzący z mięśni szkieletowych jest indukowany przez bodźce nocycyptywne, które prowadzą do podrażnienia receptorów czucia somatycznego (*opisanych przez Autora we Wstępie*). Ból patologiczny, który sygnalizuje proces chorobowy, jest z reguły tępy i ścisający; objawy nasilają się wraz z postępującym uszkodzeniem i stanem zapalnym zajętych tkanek, szybko przechodzą w stan chroniczny. Ból fizjologiczny występujący w czasie wysiłku fizycznego (maksymalnego skurczu izometrycznego) ma charakter ostry, i chroni mięśnie przed działaniem czynników szkodliwych, jak ATP oraz jony wodorowe w stężeniach niefizjologicznych/patologicznych. Natomiast ból fizjologiczny pojawiający się kilkanaście godzin po zakończeniu wysiłku (o przewadze aktywności ekscentrycznej) jest spowodowany uwalnianiem mediatorów reakcji zapalnej, jak czynniki

chemotaktyczne, reaktywne formy tlenu i azotu, cytokiny, erytropoetyna, czynniki wzrostu i in. Szczyt dolegliwości przypada na pierwszą – drugą dobę po wysiłku, nie zależy od stanu energetycznego mięśni i zmian pH, ale od rozległości uszkodzeń tkankowych [Kanda K i wsp. Exerc Immunol Rev 2013; Żołądź JA. Bóle mięśniowe i uwalnianie miokina. W: Fizjologia człowieka. red. Konturek SJ. Wyd. Elsevier Urban & Partner 2013]. W każdym przypadku, podstawowa funkcja bólu to rola ostrzegawczo-ochronna [Dobrogowski J i wsp. Polski Przegląd Neurologiczny 2011].

Przedstawiona mi do recenzji praca została zrealizowana w Zakładzie Biochemii Akademii Wychowania Fizycznego im. Eugeniusza Piaseckiego w Poznaniu – jednym z wiodących polskich ośrodków prowadzących badania nad morfologią i właściwościami nocycceptorów mięśniowych. Stanowi ona rozwinięcie wieloletniego zainteresowania Zakładu Biochemii subiektywnymi doznaniem bólowymi pochodzącymi z mięśni szkieletowych.

Praca ma objętość 110 stron i posiada typowy układ stosowany w rozprawach doktorskich z podziałem na: wstęp, cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusja, wnioski i bibliografia oraz streszczenie (w wersji polskiej i angielskiej). W tekście pracy znajduje się 15 tabel i 17 rycin. Piśmiennictwo obejmuje 275 pozycji, pochodzących głównie z ostatnich kilkunastu lat. Dominują wśród nich pozycje anglojęzyczne.

We wprowadzeniu Autor przedstawia przyczyny powstawania odczucia bólowego, głównie bólu niedotlenieniowego (ostre i przewlekłe niedotlenienie mięśnia sercowego, niedotlenienie mięśni szkieletowych, niedotlenienie mózgu) oraz możliwości monitorowania niedokrwienia kończyn za pomocą wskaźników biochemicznych i fizjologicznych, analizy uczucie zimna w dystalnej części kończyny oraz ilościowej oceny czucia bólu metodą QST (ang. *quantitative sensory testing*).

W rozdziale „Cel pracy” Autor przedstawia dwa zadania badawcze: <sup>1</sup> pomiar wybranych wskaźników biochemicznych i hematologicznych krwi, <sup>2</sup> analiza odpowiedzi organizmu na niedotlenienie kończyny górnej poddanej wysiłkowi fizycznemu w zakresie odbioru czynników sensorycznych. Z analizy pracy wynika, że **celem było wyjaśnienie, który z czynników generowanych w trakcie wysiłku fizycznego o przewadze skurczy izometrycznych oraz indukowanego niedotlenienia aktywnych mięśni odpowiada za doznania bólowe.** Na potrzeby eksperymentu Autor opracował model niedotlenienia kończyny górnej!

Rozdział „Materiał i metody” określa badaną grupę: 43 zdrowych młodych mężczyzn zakwalifikowanych do czterech grup doświadczalnych: 12-osobowa grupa nietreningowa poddana jednej próbie wysiłkowej z opaską uciskową na przedramieniu, 11-osobowa grupa nietreningowa poddana dwóm próbom wysiłkowym z opaską uciskową na przedramieniu, 10-osobowa grupa zawodników futbolu amerykańskiego poddana jednej próbie wysiłkowej z opaską uciskową na przedramieniu, 10-osobowa grupa nietreningowa poddana jednej próbie wysiłkowej bez opaski uciskowej.

Na podstawie wywiadu, do badań zakwalifikowano wyłącznie osoby niewykazujące zaburzeń neurologicznych w zakresie odbioru i przetwarzania bodźców sensorycznych. Autor przedstawił charakterystykę antropometryczną czterech grup doświadczalnych z uwzględnieniem obwodu i długości prawego przedramienia, na którym umieszczano 1 cm powyżej dołu łokciowego opaskę uciskową wywołującą niedotlenienie kończyny górnej wykonującej wysiłek. Próba wysiłkowa polegała na rytmicznym ściskaniu dynamometru ręcznego na poziomie 40% maksymalnej wartości siły ścisku dłoni (skurcze izometryczne). We krwi żyłnej pobranej przed wysiłkiem (lewa ręka) i po wysiłku (prawa ręka) oznaczono całkowite stężenie albumin i stężenie albuminy modyfikowanej niedotlenieniem (IMA) oraz całkowitą aktywność kinazy kreatynowej (CK). We krwi włosniczkowej oznaczono wskaźniki równowagi kwasowo-zasadowej (pH, pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), stężenie mleczanu przed w 1, 5, 15, 30 i 45 minucie po zakończeniu wysiłku oraz wykonano morfologię krwi. Przed i po wysiłku przeprowadzono ilościową ocenę czucia metodą QST wybranych wskaźników: dotykowy próg detekcji, próg wibracji i próg bólu uciskowego. Do tej pory metodę QST zastosowano w jednej pracy - Tesarz J. i wsp. [Pain 2013; 154: 1022-9, doi: 10.1016/j.pain.2013.03.014], której niestety autor nie zacytował. Po wywołaniu niedotlenienia i/lub zakończeniu próby wysiłkowej monitorowano zmiany temperatury prawej dłoni w 1, 5, 15, 30 i 45 min za pomocą kamery termowizyjnej.

W rozdziale „Materiał i metody” zbyt obszernie opisano procedurę pobierania krwi włosniczkowej i krwi żyłnej przypominając instrukcję dla początkującej laborantki „*Podkazu miejscu pobrania wacikiem nasączonym spirytusem, następowało pobranie około 10 ml krwi z żyły łokciowej. materiał ten rozdzielano do trzech próbek...*” Czy nie było możliwości oznaczenia wskaźników biochemicznych, jak CK, albuminy i IMA, w jednym materiale biologicznym np. w surowicy? Zastosowanie odnośników przy opisie metod utrudnia czytanie pracy i zrozumienie, tym bardziej, że autor odsyła czytelnika do pkt. 6 lub pkt. 5 metodyki (str. 32, pkt. h, pkt. j), a rzeczywistości jest to pkt. 3.6 i pkt. 3.5 metodyki.

Uzyskane wyniki badań poddano analizie statystycznej za pomocą testów nieparametrycznych, których zastosowanie wydaje się wątpliwe. Mamy 4 grupy niezależne i dwa terminy badań - przed i po interwencji - czyli dwa czynniki *kind of training x time*. Dlatego dobór, jednoczynnikowej analizy wariancji, niezależnie czy w wersji parametrycznej czy odpowiednik nieparametryczny (test Kruskala-Wallisa) wydaje się być niewłaściwy. Proponuję zrobić rekalkulację wyników przed wysłaniem do publikacji. W innym, nowym podejściu można zastosować analizę wielkości efektów, o czym sporo pisze Will Hopkins (Making Meaningful Inferences About magnitudes; Alan M Batterham, Will G Hopkins –

[https://www.researchgate.net/profile/Alan\\_Batterham/publication/23711947\\_Making\\_meaningful\\_inferences\\_about\\_magnitudes/links/0912f50e7096419ac8000000](https://www.researchgate.net/profile/Alan_Batterham/publication/23711947_Making_meaningful_inferences_about_magnitudes/links/0912f50e7096419ac8000000)

Dobrym rozwiązaniem jest tzw. zróżnicowanie wielkości delt – Autor opisuje rezultaty zastosowania tej metody w rozdziale Wyniki (str.61), ale nie wyjaśnia w rozdziale „Materiał i metody”.

Rozdział „Wyniki” obejmuje analizę wskaźników rkz i wskaźników biochemicznych oraz elementów morfotycznych krwi i wybranych wskaźników testu QST, z zaznaczeniem statystycznie istotnych różnic pomiędzy analizowanymi grupami. Szczegółowe wyniki przedstawione są w 9 tabelach i na 15 rycinach.

W odniesieniu do wskaźników rkz i aktywności CK, Autor nie stwierdza statystycznie istotnych różnic między grupami badanych mężczyzn. W przypadku zmian stężenia mleczanu i IMA, zaobserwowano istotny wzrost stężenia obu wskaźników w grupach poddanych próbie wysiłkowej z indukowanym lokalnym niedotlenieniem, w przeciwieństwie do grupy kontrolnej. Ciekawe są zmiany wartości dotykowego progu detekcji (MDT); wyraźny/istotny wzrost w grupach poddanych próbie wysiłkowej z indukowanym niedotlenieniem. Największe zmiany wartości dotykowego progu detekcji, podobnie jak obniżenie temperatury dłoni, wykazano w grupie dwukrotnie poddanej próbie wysiłkowej z indukowanym niedotlenieniem. Zdecydowanie mniejsze zmiany wykazano w przypadku wartości progu wibracji (VDI) i uciskowego progu bólu (PPT) we wszystkich grupach (B1, B2 i B3) poddanych wysiłkowi i lokalnemu niedotlenieniu.

Zmiany liczby leukocytów nie są duże, rzędu 0,1 – 0,5 przy bardzo dużym odchyleniu standardowym w grupach (ryc.15), stad moje duże wątpliwości czy analiza została

przeprowadzona prawidłowo. W przypadku grupy kontrolnej (ostatnie dwa czerwone słupki na ryc.15) niemożliwa jest różnica statystycznie istotna?

W ostatnim punkcie sekcji Wyniki badań, Autor analizuje modele delta (brak wyjaśnienia w części „Materiał i metody” pkt. 3.10) dla grupy B1 + B3 (nietreningujący + zawodnicy futbolu amerykańskiego). Niezrozumiałe jest dla mnie połączenie obu grup dla tworzenia modeli delta. Ilościowa ocena czucia bólu metodą QST w grupie B3 wykazała zmiany statystycznie istotne dla wartości dotykowego progu detekcji (MDT; ryc.7) i dla wartości progu wibracji (VDT; ryc.8), ale brak istotnych zmian wartości dla uciskowego progu bólu (PPT; ryc.9). W przypadku grupy B1/nietreningujący sytuacja jest odwrotna. Niezrozumiałe jest dla mnie akapit str. 62 „*W kolejnym modelu, który był istotny statystycznie  $p = 0,0099$  (tab. 11), delta PPT została wyjaśniona przez deltę mleczanu 29%. Rozważając kolejny model możemy stwierdzić, że wraz z zmniejszeniem delty mleczanu obniżała się delta PPT*”. Grupa zawodników futbolu amerykańskiego charakteryzowała się najwyższym wzrostem stężenia mleczanu przy braku istotnych zmian PPT.

Dyskusja rozpoczyna się od bardzo obszernego omówienia (4,5 strony) zmian wskaźników antropometrycznych (masa ciała, BMI, obwód i długość ramienia) i sile ścisku u zawodników futbolu amerykańskiego w porównaniu do wyników innych autorów. Czy to było celem badań? Z opisu w części „Materiał i metody” wynika, że pomiar obwodu i długości ramienia miał na celu określenie warunków przeprowadzenia eksperymentu, a próba wysiłkowa z wykorzystaniem dynamometru ręcznego miała na celu wywołanie bólu fizjologicznego spotęgowanego niedotlenieniem indukowanym umieszczeniem opaski uciskowej na przedramieniu. Autor na stronie 68-69 stwierdza „*Interesujące, że większość prac z obszaru niedotlenienia mięśni szkieletowych, dotyczy kończyn dolnych*”. Pytanie, które nasuwa się już od początku pracy – czym była podyktowana decyzja o przeprowadzeniu badań z niedotlenieniem kończyny górnej?

Na stronie 69 dyskusji akapit zaczyna się od „*Wykładniki gospodarki kwasowo-zasadowej ... ich wartości mogą wskazać na ewentualny wymiar fizjologicznego dyskomfortu*” W znanych mi podręcznikach m.in. cytowany przez Autora podręcznik red. Dembińska-Kieć i Naskalski, stosowane są określenia: wskaźniki rkz, parametry rkz, zaburzenia rkz, badania rkz itp.

Zdecydowanie najciekawszą częścią dyskusji jest akapit omawiający zmiany albuminy modyfikowanej niedotlenieniem (IMA) - obecnie uważanej za bardzo wartościowy wskaźnik oceny ryzyka powikłań powysiłkowych u osób z niedotlenieniem naczyń obwodowych i/lub

mięśnia sercowego [Bakula i wsp. Clin Lab 2016; Falkensammer i wsp. Clin Chim Acta. 2015].

Praca podsumowana jest w formie pięciu punktów, ale brakuje wniosku będącego odpowiedzią na postawiony cel badań. Ostatnie zdanie w pkt. 5 „*Powyższe wskazuje to, że niedotlenienie można rozpatrywać jako czynnik modulujący indukcję lub przebieg procesu zapalnego*” mogłoby stanowić wniosek z przeprowadzonych badań, ale wymaga korekty stylistycznej i częściowo merytorycznej, ponieważ autor analizował odpowiedź immunologiczną (zmiany liczby komórek immunologicznych), nie zapalną (nie przeprowadzono analizy zmian stężenia mediatorów r-cji zapalnej).

Przedstawione powyżej zastrzeżenia nie umniejszają jednak nowatorskiego aspektu pracy - jest to pierwsze znane mi badanie z indukcją niedotlenienia kończyny górnej. Dużą wartością pracy jest analiza doznań bólowych za pomocą wskaźników testu QST i zmian stężenia IMA w opracowanym przez Autora modelu przejściowego/okresowego niedotlenienia (*exercise-stress induced transitory ischemia*).

Podsumowując, przedstawiona mi do recenzji spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim i kwalifikuje Doktoranta do nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk o kulturze fizycznej. Zwracam się zatem do Wysokiej Rady Wydziału Wychowania Fizycznego Akademii Wychowania Fizycznego im. Eugeniusza Piaseckiego w Poznaniu o dopuszczenie mgr Bartosza Trawińskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Zielona Góra 27.05.2016

