

„Wpływ 12 tygodniowego interwałowego wysiłku fizycznego o zwiększonej intensywności na poziom stanu zapalnego, aktywność antyoksydantów oraz specyficznych mikroRNA w surowicy u pacjentów z idiopatyczną postacią choroby Parkinsona.” Mgr Paulina Małczyńska-Sims

Choroba Parkinsona (chP) jest chorobą zwyrodnieniową układu nerwowego charakteryzującą się drastycznym spadkiem dopaminy w prążkowie, co doprowadza do szeregu objawów osiowych choroby. Rozwój choroby związany jest z szeregiem zmian biochemicznych takich jak ubytek hydroksylazy tyrozynowej (TH), agregację białka alfa synukleiny, stan zapalny w mózgu, spadek poziomu neurotrofin, wzrost stresu oksydacyjnego oraz apoptozy. Wzrost stężenia cytokin prozapalnych oraz zaburzenie ich udziału w stosunku do antyzapalnych, doprowadza do rozszczelnienia bariery krew-mózg, a także prawdopodobnie do pobudzenia komórek obwodowego układu immunologicznego, doprowadzając do czynnego udziału ich w rozwoju chP. Intensywny wysiłek fizyczny z uwagi na indukcję procesów przeciwzapalnych i neuroprotektoryjnych, jest wykorzystywany do wspomagania leczenia chorób i profilaktyce a tym samym do poprawy jakości życia ludzi. Dotychczasowe doniesienia na temat wysiłku interwałowego o wzmożonej intensywności (ang. high-intensity-interval training, HIIT) u osób chorych na chP dowodzą, że długotrwały wysiłek powoduje wzrost neurotrofin takich jak BDNF, przez co może wpłynąć na obniżenie poziomu stanu zapalnego poprzez zmniejszenie stężenia cytokin prozapalnych. Uważa się, że długotrwały HIIT poprzez chwilowy wzrost parametrów zapalnych i oksydacyjnych, może modulować odpowiedź immunologiczną, prowadząc do wzrostu indukcji cytokin przeciwzapalnych takich jak IL-10, a także usprawnienia mechanizmu antyoksydacyjnego. Mimo, iż w ostatnich latach coraz więcej badań wykorzystuje długotrwałe procesy treningu wytrzymałościowego u osób z chP, do tej pory nie zbadano ich wpływu na stan zapalny zarówno obwodowy jak i mózgowy.

Celem niniejszych badań ujętych w rozprawie doktorskiej jest zbadanie wpływu 12 tygodniowego wysiłku interwałowego o wzmożonej aktywności (HIIT) na procesy zapalne pochodzenia mózgowego i obwodowego oraz stres oksydacyjny u osób w średniozaawansowanym stadium chP.

Cel badań realizowano poprzez następujące cele szczegółowe:

1. Analiza i charakterystyka procesów zapalnych u chorych na chorobę Parkinsona w odniesieniu do grupy kontrolnej przeprowadzona na podstawie: a) Oznaczenia parametrów układu białej krwi; b) Oznaczenia w surowicy poziomu czterech cytokin (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10); c) Zbadania poziomu dwóch białek pochodzenia mózgowego: GFAP i S100 β w surowicy; d) Oznaczenia w surowicy poziomu katalazy (CAT) oraz dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), oraz całkowitego glutationu (GSH); e) Zbadania w surowicy poziomu 5 miRNA (miR-7, miR-23b, miR-30e, miR-146a, miR-155) związanych z regulacją procesów zapalnych; f) Oszacowanie korelacji oznaczonymi białkami a danymi demograficznymi i klinicznymi a także pomiędzy poszczególnymi białkami i interakcje białko-miRNA dla poszczególnych zależności.

2. Analiza wpływu 12 tygodniowego treningu interwałowego o wzmożonej aktywności na procesy zapalne i antyoksydacyjne u osób chorych na chorobę Parkinsona.

3. Analiza potencjalnych długotrwałych zmian w stężeniu cytokin, białek mózgowych, parametrów hematologicznych, antyoksydantów oraz miRNA wywołanych na skutek wysiłku fizycznego u chorych na chPw okresie 3 miesięcy od dnia zakończenia treningu.

Hipoteza badawcza niniejszych badań zakłada, iż 12 tygodniowy interwałowy wysiłek fizyczny o zwiększonej intensywności może modulować stan zapalny i stres oksydacyjny u chorych na chorobę Parkinsona.

W badaniu wzięło udział 28 osób ze zdiagnozowaną idiopatyczną chP oraz 20 osób zdrowych którzy stanowili grupę kontrolną. Podstawowym kryterium włączającym do badania była zdiagnozowana chP w stadium 1- 2,5 pkt w skali Hoehn i Yakra. Jako kryterium wykluczające były oznaki demencji, towarzyszące choroby psychiatryczne neurologiczne czy nowotworowe i zaawansowane stadium chP powyżej 2,5 pkt w skali Hoehn i Yakra. W pierwszej części badania zbadano parametry stanu zapalnego u 28 osób z chP oraz u 20 osobach z grupy kontrolnej. W dalszej części badania grupę 28 osób z chP podzielono na dwie grupy TR-PD oraz NTR-PD. Przydzielenie do grup odbyło się na drodze wyboru uczestników (nielosowo). Pierwszą grupę stanowiło 15 osób z chP, którzy podjęli się uczestnictwa w 12 tygodniowym programie HIIT (grupa TR-PD). Drugą grupę stanowiło 13 osób, które w przeciągu 12 tygodni nie ćwiczyły, stanowiąc grupę kontrolną (grupa NTR-PD). Grupa TR-PD została poddana 12 tygodniowemu cyklowi treningowemu na cykloergometrach stacjonarnych. Cykl treningu HIIT składał się z 3 sesji treningowych w tygodniu łącznie dając 36 sesji treningowych. Każda 60-minutowa sesja treningowa składała się z fazy rozgrzewającej (10 minut), 40 minut sesji interwałowej oraz 10 minut fazy roztrenowania kończącej trening. Pacjenci mieli za zadanie pedałowac około 60-80% HRmax. Trening przebiegał w fazie ON, czyli po przyjęciu leków przeciwparkinsonowskich. Krew została pobrana w trzech punktach czasowych: tydzień przed rozpoczęciem treningu, tydzień po zakończeniu treningu oraz 3 miesiące po zakończonym treningu.

Uzyskana krew w badaniu została wykorzystana do przeprowadzenia oznaczenia parametrów hematologicznych, wolno krążących cytokin, białek astrocytarnych, antyoksydantów oraz 5 specyficznych miRNA w surowicy. Ponadto, z uzyskanych wyników parametrów hematologicznych zostały wyliczone wskaźniki obwodowego stanu zapalnego.

Wyniki badań wykazały istotnie ($p < 0,05$) podwyższoną liczbę neutrofilów oraz wskaźnika NMR w grupie osób z chP w porównaniu do grupy kontrolnej. Ponadto procentowa liczebność monocytów była statystycznie obniżona u chorych na chP. Zmianom tym towarzyszyły podwyższone stężenia białek astrocytarnych GFAP oraz S100 β , podwyższony poziom IL-6 i drastyczny spadek poziomu całkowitego GSH. Ponadto, poziom wszystkich oznaczanych miRNA był obniżony w stosunku do osób zdrowych.

Wyniki analizy wpływu 12 tygodniowego programu HIIT na stan zapalny u osób z chP wykazał spadek poziomu TNF- α oraz wzrost stężenia IL-10 w surowicy u osób z grupy TR-PD. Ponadto, liczba neutrofilów uległa znamiennej spadkowi czemu towarzyszył spadek poziomu wskaźników NLR i SII. Poziom SOD uległ gwałtownemu wzrostowi w grupie TR-PD po 12 tygodniowym treningu HIIT, a zmiana stężenia CAT różniła się znamiennej pomiędzy grupą TR-PD (wzrost stężenia) a grupą NTR-PD (spadek stężenia). Poziom ekspresji miR-146a był

statystycznie podwyższony po HIIT. W obu grupach odnotowano wzrost procentowej liczby monocytów, białka S100 β oraz miR-23b.

Po 12 tygodniach od zakończenia programu HIIT nie zaobserwowano statystycznych zmian w parametrach hematologicznych, poziomie cytokin oraz wskaźników obwodowego stanu zapalnego. Poziom SOD uległ obniżeniu do poziomu wyjściowego w grupie TR-PD. Poziom ekspresji miR-23b uległ obniżeniu w grupie TR-PD oraz NTR-PD w stosunku do poziomu ekspresji po treningu HIIT.

Największym osiągnięciem tej pracy jest wykazanie pozytywnego wpływu HIIT na obwodowy stan zapalny u osób z chP. Uzyskane wyniki pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków:

1) Chroniczny obwodowy i ośrodkowy stan zapalny spowodowany zmianą ilości neutrofilów, monocytów, wskaźników obwodowego stanu zapalnego, oraz podwyższenie stężenia czynników stanu zapalnego (białek GFAP oraz S100 β , IL-6), obniżenie poziomu uczestniczących w ich regulacji miRNA (miR-7, miR-23b, miR-30e, miR146a oraz miR-155) i rozszczelnienia bariery krew-mózg może przyczyniać się do wzrostu procesów neurodegeneracyjnych w chP a tym samym postępu choroby.

2) Drastyczne obniżenie stężenia całkowitego GSH w surowicy u osób chorych na chP w porównaniu do grupy kontrolnej, bez zmian poziomu aktywności SOD oraz CAT może wskazywać, że w pierwszej kolejności dochodzi do uszkodzenia nieenzymatycznych antyoksydantów. Enzymy takie jak SOD czy CAT mogą być bardziej odporne na zmiany wywołane przez chP.

3) 12 tygodniowy HIIT powoduje zmniejszenie obwodowego stanu zapalnego w grupie TR-PD poprzez obniżenie poziomu neutrofilów i wskaźników obwodowego stanu zapalnego takich jak NLR, NMR oraz SII.

4) Obniżenie poziomu stanu zapalnego przy jednoczesnym wzroście mechanizmów przeciwzapalnych oraz antyoksydacyjnych po procesie treningowym HIIT wskazuje na jego prawdopodobny udział w zahamowaniu bądź opóźnieniu postępu choroby.

5) Obniżenie stężenia TNF- α oraz IL-6 może być związane z wzrostem poziomu miRNA miR-23b oraz miR-146a, które są bezpośrednimi i pośrednimi regulatorami tych cytokin, w surowy po HIIT wskazuje na prawdopodobną modulację stanu zapalnego przez HIIT poprzez zwiększenia ekspresji miRNA, które wpływają na regulację ekspresji genów.

6) W okresie 12 tygodni od zakończenia treningu nie zaobserwowano zmian w parametrach hematologicznych, wskaźnikach obwodowego i mózgowego stanu zapalnego, oraz części antyoksydantów wskazując na prawdopodobne tendencje do utrwalenia zmian wywołanych przez HIIT, bez efektu szybkiego powrotu do poziomu wyjściowego.

7) Wykorzystanie programu HIIT w chP ale także innych chorobach o podłożu neurodegeneracyjnym może okazać się skuteczną formą wspomagania leczenia farmakologicznego.

8) Systematyczne wykonywanie ćwiczeń i utrzymywanie wysokiego poziomu intensywności może poprzez zwiększenia ekspresji miRNA uczestniczyć w regulacji poziomu czynników anty i prozapalnych, obniżać stan zapalny w organizmie powodując opóźnienie bądź zahamowanie progresji choroby.

Parkinson's disease (PD) is a degenerative disease of the nervous system characterized by a drastic decrease in striatal dopamine, leading to a number of the disease's symptoms. The development of the disease is associated with several biochemical changes such as the loss of tyrosine hydroxylase (TH), aggregation of the alpha-synuclein protein, neuroinflammation, a decrease in the level of neurotrophins, an increase in oxidative stress, and apoptosis. The increase in the concentration of pro-inflammatory cytokines and the disruption of their role in anti-inflammatory cytokines leads to the higher permeability of the blood-brain barrier, and probably to the stimulation of the cells of the peripheral immune system, leading to their active participation in the development of PD. Intensive physical effort, due to the induction of anti-inflammatory and neuroprotective processes, is used to support disease treatment and prevention, and thus to improve the quality of human life. Previous reports on high-intensity interval training (HIIT) in people with PD show that prolonged exercise increases neurotrophins such as BDNF, which may reduce the level of inflammation by reducing the concentration of proinflammatory cytokines. It is believed that long-term HIIT, through a temporary increase in inflammatory and oxidative parameters, may modulate the immune response, leading to an increase in the induction of anti-inflammatory cytokines such as IL-10, as well as an improvement in the antioxidant mechanism. Although in recent years more and more studies have used long-term endurance training processes in people with PD, its effects on peripheral and cerebral inflammation have not yet been investigated.

The purpose of this research is to investigate the impact of 12 weeks of high-intensity interval training (HIIT) on inflammatory processes of cerebral and peripheral origin and oxidative stress in people in the intermediate stage of PD.

The aim of the research was achieved through the following specific objectives:

- 1.** Analysis and characterization of inflammatory processes in patients with Parkinson's disease in relation to the control group based on: **a)** Determination of the parameters of the white blood cell system; **b)** Determination of the serum levels of the four cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10); **c)** Examination of the level of two proteins: GFAP and S100 β in the serum; **d)** Determination of serum levels of catalase and superoxide dismutase, and total glutathione; **e)** Testing the serum level of 5 miRNAs (miR-7, miR-23b, miR-30e, miR-146a, miR-155) related to the regulation of inflammatory processes; **f)** Estimation of the correlation of the determined proteins with demographic and clinical data as well as between individual proteins and protein-miRNA interactions for individual relationships.
- 2.** Analysis of the effect of 12 weeks of HIIT on inflammatory and antioxidant processes in people with Parkinson's disease.
- 3.** Analysis of potential long-term changes in the concentration of cytokines, brain proteins, hematological parameters, antioxidants, and miRNAs induced by exercise in PD patients within 3 months from the end of training.

The research hypothesis of this study assumes that 12-week of HIIT may modulate inflammation and oxidative stress in patients with Parkinson's disease.

The study involved 28 people diagnosed with idiopathic PD and 20 healthy people who constituted the control group. The basic criterion for entering the study was diagnosed PD at stage 1 - 2.5 points on the Hoehn and Yahr scale. The exclusion criteria were the signs of dementia, accompanying psychiatric neurological diseases or cancer, and the advanced stage of PD above 2.5 points on the Hoehn and Yahr scale. In the first part of the study, the parameters of inflammation were examined in 28 people with PD and 20 people in the control group. In the further part of the study, the group of 28 people with PD was divided into two groups: TR-PD and NTR-PD. Assignment to groups was done by selecting participants (non-randomly). The first group consisted of 15 PD patients who took part in the 12-week HIIT program (TR-PD group). The second group consisted of 13 people who had not exercised within 12 weeks, constituting as the control group (NTR-PD group). The TR-PD group underwent a 12-week training cycle on stationary cycloergometers. The HIIT training cycle consisted of 3 training sessions per week for a total of 36 training sessions. Each 60-minute training session consisted of a warm-up phase (10 minutes), a 40-minute interval session, and a 10-minute de-training phase to end the training. Patients were tasked with pedaling approximately 60-80% of HRmax.

The training took place in the ON phase, i.e. after taking anti-Parkinsonian medications. Blood was drawn at three-time points: one week before training, one week after training, and three months after training. The blood obtained in the study was used to determine the hematological parameters, free circulating cytokines, astrocytic proteins, antioxidants, and 5 specific miRNAs in the serum. Moreover, indicators of peripheral inflammation were calculated from the results of hematological parameters.

The results of the study showed a significantly ($p < 0,05$) increased number of neutrophils as well as NMR index in the group of people with PD compared to the control group. Moreover, the percentage of monocytes was statistically reduced in PD patients. These changes were accompanied by increased concentrations of the astrocytic proteins GFAP and S100 β , increased levels of IL-6, and a drastic decrease in the level of total GSH. Moreover, the level of all measured miRNAs was lower than in healthy subjects.

The results of the analysis of the influence of the 12-week HIIT program on inflammation in people with PD showed a decrease in the level of TNF- α and an increase in the concentration of IL-10 in the serum in people from the TR-PD group. Moreover, the number of neutrophils decreased significantly, which was accompanied by a decrease in the level of NLR and SII indicators. The level of SOD increased rapidly in the TR-PD group after 12 weeks of HIIT training, and the change in CAT concentration differed significantly between the TR-PD group (increase in concentration) and the NTR-PD group (decrease in concentration). The expression level of miR-146a was statistically increased after HIIT. In both groups, there was an increase in the percentage of monocytes, S100 β protein, and miR-23b.

After 12 weeks from the end of the HIIT program, no statistical changes in hematological parameters, cytokine levels, and indicators of peripheral inflammation were observed. The SOD level decreased to the baseline level in the TR-PD group. The level of miR-23b expression was decreased in the TR-PD and NTR-PD groups as compared to the expression level after HIIT training.

The greatest achievement of this work is the demonstration of the positive effect of HIIT on peripheral inflammation in people with PD. The obtained results allowed for the formulation of the following conclusions:

1. Chronic peripheral and central inflammation caused by changes in the number of neutrophils, monocytes, systemic inflammation markers, and an increase in the concentration of inflammatory factors (GFAP and S100 β , IL-6), a decrease in the level of miRNAs involved in their regulation (miR-7, miR-23b, miR-30e, miR146a, and miR-155) and the higher permeability of the blood-brain barrier, may contribute to the increase in neurodegenerative processes in PD and thus the disease progression.
2. A drastic reduction in serum total glutathione in PD patients compared to controls, without changes in the level of SOD and CAT, may indicate that non-enzymatic antioxidants are damaged first. Enzymes such as SOD and CAT may be more resistant to changes caused by PD.
3. 12-week HIIT reduces peripheral inflammation in the TR-PD group by lowering neutrophil levels and markers of peripheral inflammation such as NLR, NMR, and SII.
4. Reducing the level of inflammation with a simultaneous increase in anti-inflammatory and antioxidant mechanisms after the HIIT training process indicates its possible contribution to the inhibition or delay of disease progression.
5. The decrease in the concentration of TNF- α and IL-6 may be associated with an increase in the miRNA levels of miR-23b and miR-146a, which are direct and indirect regulators of these cytokines, in severe post-HIIT, it indicates a possible modulation of inflammation by HIIT by increasing miRNA expression, which affect the regulation of genes expression.
6. Within 12 weeks of the end of the training, no changes in hematological parameters, indicators of peripheral and cerebral inflammation, and some antioxidants were observed, indicating a probable tendency to the persistence of changes caused by HIIT, without the effect of a quick return to the baseline level.
7. The use of the HIIT program in PD, but also other neurodegenerative diseases, may turn out to be an effective form of supporting pharmacological treatment.
8. Systematic exercise and maintaining a high level of intensity may, by increasing the expression of miRNA, participate in the regulation of the level of anti and pro-inflammatory factors, reduce inflammation in the body, delaying or inhibiting disease progression.