

Instytut Fizyki im. Augusta Chełkowskiego
Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych
Uniwersytet Śląski w Katowicach

Rozprawa doktorska

**Różnicowa kalorymetria skaningowa jako
nowatorska metoda w ocenie efektów
wspomagania treningu sportowego**

mgr inż. Klaudia Duch

Promotor: dr hab. Anna Michnik, prof. UŚ

Chorzów, 2022

Podziękowania

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania mojemu promotorowi Pani dr hab. Annie Michnik, prof. UŚ za nieocenioną pomoc udzieloną w trakcie przygotowywania pracy doktorskiej, cierpliwość i wyrozumiałość oraz motywację do krytycznego spojrzenia na problematykę badawczą.

Chciałam podziękować Paniom: Kierownik Zakładu Fizjologii dr hab. Ilonie Pokorze, prof. AWF Katowice, oraz Kierownik Zakładu Biomedycznych Podstaw Aktywności Fizycznej Pani dr hab. Ewie Sadowskiej-Krępie, prof. AWF Katowice za udostępnienie materiału do badań, możliwość uczestnictwa w realizacji projektów badawczych i merytoryczną pomoc bez, których niniejsza praca nie powstałaby.

Szczególne podziękowania składam Rodzicom i Mężowi Dawidowi za wsparcie, motywację i anielską cierpliwość w czasie realizacji i pisania pracy doktorskiej.

Pragnę podziękować Agnieszce Kielboń i Izabeli Schisler za wspólnie wykonane pomiary, spędzony razem czas, liczne rozmowy i wsparcie.

Dziękuję również Pani Kierownik Martynie Kantorysińskiej i współpracownikom za wsparcie i wiarę w powstanie tej pracy doktorskiej.

Klaudia Duch

Spis treści

Streszczenie	5
Abstract	6
1. Wprowadzenie	7
1.1. Surowica krwi ludzkiej jako materiał diagnostyczny	8
1.1.1. Proteom osocza/surowicy krwi	8
1.1.2. Główne frakcje białek surowicy	9
1.1.3. Odzwierciedlenie stanu zdrowia i zmian w fizjologii człowieka w proteomie surowicy krwi	10
1.2. Skaningowa kalorymetria różnicowa (DSC) w badaniach białek i płynów fizjologicznych	12
1.2.1. Klasyfikacja kalorymetrów	12
1.2.2. Informacje o technice i krzywych DSC białek	14
1.2.3. Zastosowanie metody DSC w diagnostyce medycznej	20
1.3. Trening w sportach siłowych i wytrzymałościowych	24
1.3.1. Fizjologia wysiłku fizycznego	24
1.3.2. Różnice pomiędzy wysiłkiem siłowym i wytrzymałościowym	24
1.3.3. Metody wspomagania treningu sportowego	26
2. Metodyka badań	31
2.1. Materiał pomiarowy	31
2.2. Aparatura pomiarowa	33
2.3. Opracowanie wyników pomiarowych	35
3. Cel pracy	36
4. Opis badań własnych - synteza	39
4.1. Prezentacja krzywych DSC wodnych roztworów surowicy krwi osób uprawiających różne dyscypliny sportowe	41
4.2. Wpływ wysiłku fizycznego na profile DSC surowic	44
4.3. Wpływ stosowania w trakcie treningu suplementacji lub zabiegów odnowy biologicznej na zmiany zachodzące w surowicy krwi odzwierciedlone w profilach DSC	54
5. Wykaz artykułów stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej wraz z oświadczeniami współautorów	63
5.1. Michnik A, Sadowska-Krępa E, Domaszewski P, Duch K, Pokora I. Blood serum DSC analysis of well-trained men response to CrossFit training and green tea extract supplementation. <i>Journal of Thermal Analysis and Calorimetry</i> (2017, 130, 1253–1262), doi 10.1007/s10973-017-6346-9	63
5.2. Duch K, Michnik A, Pokora I, Sadowska-Krępa E, Kielboń A. Whole-body cryostimulation impact on blood serum thermal denaturation profiles of cross-country skiers. <i>Journal of Thermal Analysis and Calorimetry</i> (2019, 138, 4505–4511), doi 10.1007/s10973-019-08766-9	78

5.3.	Michnik A, Pokora I, Duch K, Sadowska-Krępa E. Differential scanning calorimetry reveals that whole-body cryostimulation in cross-country skiers can modify their response to physical effort. <i>Journal of Thermal Analysis and Calorimetry</i> (2021, 143, 255–264), doi 10.1007/s10973-020-09285-8	90
5.4.	Duch K, Michnik A, Pokora I, Sadowska-Krępa E. Modification of blood serum DSC profiles by sauna treatments in cross-country skiers during the exercise cycle. <i>Journal of Thermal Analysis and Calorimetry</i> (2020, 142, 1927–1932), doi 10.1007/s10973-020-10162-7	104
5.5.	Michnik A, Duch K, Pokora I, Sadowska-Krępa E. Differences in cryostimulation and sauna effects on post-exercise changes in blood serum of athletes. <i>Complementary Therapies in Medicine</i> (2020; 51), doi 10.1016/j.ctim.2020.102453	114
5.6.	Michnik A, Sadowska-Krępa E, Kielboń A, Duch K, Bańkowski S. Blood serum denaturation profile examined by differential scanning calorimetry reflects the effort put into ultramarathon by amateur long-distance runners. <i>Journal of Thermal Biology</i> (2021) doi 10.1016/j.jtherbio.2021.103013	124
6.	Podsumowanie	136
7.	Spis rysunków	138
8.	Bibilografia.....	140

Streszczenie

Od kilkunastu lat pojawiają się doniesienia dotyczące możliwości zastosowania metody różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC) w różnych obszarach diagnostyki medycznej i medycyny sportowej w oparciu o profile termiczne osocza/surowicy krwi. W niniejszej pracy podjęto próbę oceny wpływu intensywnego wysiłku na proteom surowicy oraz efektów stosowania przez sportowców różnych form wspomagania treningu sportowego poprzez śledzenie przebiegu procesu termicznej denaturacji białek zawartych w surowicy krwi.

Badania przeprowadzono metodą DSC za pomocą mikrokalorymetru VP-DSC (MicroCal Co, Northampton, MA). Pomiar DSC wodnych roztworów surowicy wykonano w zakresie temperatur od 20° do 100°C z szybkością grzania 1°C/min, przy ciśnieniu około 1.8 atm.

W części teoretycznej niniejszej pracy, przedstawiono wybrane zagadnienia związane z proteomem surowicy krwi ludzkiej, który może być źródłem informacji na temat stanu zdrowia i zmian w procesach fizjologicznych człowieka, w tym medycznych konsekwencji długotrwałych treningów. Omówiono przydatność diagnostyczną wyników badań DSC białek oraz płynów fizjologicznych, problematykę treningu w sportach siłowych i wytrzymałościowych oraz metody wspomagania treningu sportowego.

Na podstawie cyklu sześciu tematycznie związanych, opublikowanych artykułów naukowych udało się udokumentować i przedyskutować wpływ intensywnego wysiłku na kształt i parametry termodynamiczne przejścia endotermicznego reprezentującego denaturację białek surowicy krwi. W przypadku narciarzy biegowych oraz uczestników ultramaratonu stwierdzono statystycznie istotny efekt wysiłku fizycznego, odzwierciedlony w niektórych parametrach tego przejścia. Śledząc zmiany uśrednionych parametrów termodynamicznych przejścia denaturacyjnego surowicy na różnych etapach sesji treningowych (przed- i powysiłkowy, w trakcie regeneracji po wysiłku) zaobserwowano powtarzające się charakterystyki tych zmian.

Rezultaty badań biochemicznych próbek surowicy krwi pobranych od osób uprawiających CrossFit wskazały, że suplementacja ekstraktem z zielonej herbaty GTE, może mieć łagodzący wpływ na potreningowe uszkodzenia mięśni. Jednakże, zebrane przy pomocy skaningowej kalorymetrii różnicowej wyniki DSC nie wykazały wyraźnego wpływu treningu ani suplementacji GTE na endotermiczne przejście związane z denaturacją białek surowicy. Brak jakichkolwiek statystycznie istotnych różnic pomiędzy uśrednionymi wartościami parametrów przejścia mógł być spowodowany zaobserwowaną dużą zmiennością osobniczą zarówno krzywych DSC surowic jak i odpowiedzi na wysiłek uczestników tego badania.

Różnicowa kalorymetria skaningowa pozwoliła zaobserwować wpływ serii termicznych zabiegów odnowy biologicznej (kriostymulacji ogólnoustrojowej oraz sauny fińskiej) na powysiłkowe zmiany pojemności cieplnej towarzyszące procesowi denaturacji termicznej białek surowicy krwi sportowców. Zabiegi kriostymulacji całego ciała (WBC) spowodowały zmniejszenie reakcji na ćwiczenia fizyczne i przyspieszyły regenerację po wysiłku. Zabiegi sauny fińskiej wywołały przeciwny efekt, tzn. spowodowały silniejszą reakcję na wysiłek. W przypadku zabiegów sauny fińskiej zaobserwowano spore zróżnicowanie wyników DSC świadczących o cofaniu się zmian powysiłkowych podczas procesu regeneracji po ćwiczeniach.

Abstract

For several years, there have been reports on the possibility of using the Differential Scanning Calorimetry (DSC) method in various areas of medical diagnostics and sports medicine based on the thermal profiles of plasma / blood serum. In this study, by monitoring the course of the process of thermal denaturation of proteins contained in the blood serum, an attempt was made to assess the impact of intense exercise on serum proteome and the effects of the use of various forms of sports training support by athletes.

The studies were performed by DSC using a VP-DSC microcalorimeter (MicroCal Co, Northampton, MA). DSC measurements of aqueous serum solutions were carried out in the temperature range from 20 ° C to 100 ° C with a heating rate of 1 ° C / min, at a pressure of about 1.8 atm.

The theoretical part of this work presents selected issues related to the human serum proteome, which can be a source of information on health and changes in human physiological processes, including the medical consequences of long-term training. The diagnostic usefulness of DSC test results for proteins and physiological fluids, the issues of training in strength and endurance sports, and methods of supporting sports training are discussed.

Based on a series of six thematically related, published scientific articles, it was possible to document and discuss the effect of intense exercise on the shape and thermodynamic parameters of the endothermic transition representing the denaturation of blood serum proteins. In the case of cross-country skiers and ultramarathon participants, a statistically significant effect of physical effort was found, reflected in some parameters of this transition. Recurring characteristics of these changes were observed by following the changes in the averaged thermodynamic parameters of the serum denaturation transition at various stages of the training sessions (pre- and post-exercise, during post-exercise regeneration).

The results of biochemical tests of blood serum samples taken from people practicing CrossFit indicated that supplementation with GTE green tea extract may have a soothing effect on post-workout muscle damage. However, DSC results collected with differential scanning calorimetry did not show a clear effect of training or GTE supplementation on the endothermic transition associated with serum protein denaturation. The lack of any statistically significant differences between the mean values of the transition parameters could be due to the observed high inter-individual variability of both the DSC curves of the sera and the response to the effort of the participants of this study.

Differential scanning calorimetry made it possible to observe the influence of a series of thermal biological regeneration treatments (systemic cryostimulation and Finnish sauna) on post-exercise changes in heat capacity accompanying the process of thermal denaturation of the serum proteins of athletes. Whole body cryostimulation (WBC) treatments reduced responsiveness to exercise and accelerated recovery after exercise. The Finnish sauna treatments had the opposite effect, i.e. they resulted in a stronger reaction to exercise. In the case of Finnish sauna treatments, a significant variation was observed in the regression of post-exercise changes during the regeneration process after exercise.

1. Wprowadzenie

Zagadnienia dotyczące zdrowia, tajników ludzkiego organizmu i mechanizmów nim rządzących od zawsze interesowały naukowców. W ostatnich latach dzięki rozwojowi nauk ścisłych i postępowi technologicznemu powstały nowe oraz udoskonalono już stosowane techniki badawcze. Współpraca pomiędzy medycyną, biologią, fizyką, inżynierią i techniką umożliwia dążenie do skuteczniejszej i szybszej diagnostyki i terapii. Choć liczba istotnych prac naukowych dotyczących nowatorskich metod diagnostyki medycznej rośnie w szybkim tempie, zmaganie się z ciężkimi do rozpoznania w początkowych stadiach chorobami, które co roku powodują dużą śmiertelność ludzi, stale stanowi duże wyzwanie.

Nowych rozwiązań w diagnostyce, profilaktyce i monitorowaniu stanu zdrowia poszukuje także medycyna sportowa. Wyczynowi sportowcy jako grupa zmagająca się z ogromnym obciążeniem organizmu przez treningi, suplementacje, zabiegi i starty w zawodach potrzebują szczególnej opieki zdrowotnej. Organizm sportowców po sezonie startowym jest przeciążony i bardziej podatny na infekcje. W celu regeneracji organizmu oprócz samego wypoczynku stosowane są zabiegi odnowy biologicznej. Mając w perspektywie kolejny sezon startowy podawane są także wspomagające suplementy diety. Zapotrzebowanie sportowców na składniki mineralne, składniki odżywcze i witaminy jest znacznie większe niż u przeciętnego człowieka. Jeszcze nie do końca znane są skutki działania na organizm ludzki zabiegów czy suplementów diety. Jednymi z najpopularniejszych suplementów wśród sportowców są: l-karnityna, BCAA – aminokwasy rozgałęzione, kreatyna, zielona herbata, glutamina, witaminy czy kolagen. Do zabiegów odnowy biologicznej stosowanych przez sportowców należą głównie zabiegi kriostymulacji i sauny fińskiej, które są w grupie zabiegów termicznych. W przypadku kriostymulacji bodźcem stymulującym jest zimno. W saunie fińskiej ciało sportowców poddawane jest na przemienne przegrzaniu i ochładzaniu. Monitorowanie stanu zdrowia sportowców i możliwość wykorzystania nowych technik fizyko-chemicznych może pomóc w poznaniu skutków działania suplementów czy zabiegów. Dostępna, choć obszerna literatura naukowa nie dostarcza jasnej odpowiedzi na wiele pytań.

Od kilkunastu lat zintensyfikowały się próby zastosowania skaningowej kalorymetrii różnicowej (DSC) w różnych obszarach diagnostyki medycznej i medycyny sportowej. Badania DSC płynów fizjologicznych, w tym surowicy krwi, mogą być cennym źródłem informacji o stanie zdrowia pacjentów jak i kondycji fizycznej sportowców. Zmiany w metabolizmie spowodowane np. wysiłkiem fizycznym w czasie treningu sportowego odzwierciedlają się w proteomie surowicy krwi i ujawniają się w profilach termicznej denaturacji zawartych w niej białek. Metoda DSC daje zatem możliwość badania molekularnych mechanizmów odpowiedzi biologicznej organizmów żywych na różnego typu czynniki fizykochemiczne.

W badaniach związanych z rozprawą doktorską podjęto próbę nowatorskiego wykorzystania skaningowej kalorymetrii różnicowej do zbadania efektów wybranych zabiegów stosowanych w celu wspomagania treningu sportowego, na surowice krwi sportowców. Ważne jest, aby stosowane zabiegi cieplne, czy suplementacja, były bezpieczne dla zdrowia sportowców. Prowadzenie rzetelnych badań naukowych, pozwalających na weryfikację korzyści i zasadności ich podejmowania bez znaczącego ryzyka dla zdrowia, wydaje się istotne.

1.1. Surowica krwi ludzkiej jako materiał diagnostyczny

1.1.1. Proteom osocza/surowicy krwi

Proteom osocza/surowicy jest zestawem białek w nim występujących w danym momencie i nieustannie wchodzących między sobą w interakcje. Jest to białkowy odpowiednik genomu każdego organizmu, czyli kompletna informacja białkowa [1-6]. Liczba białek proteomu jest znacznie większa niż liczba kodujących je genów. Osocze jest wyjątkowym, najbardziej złożonym proteomem pochodzenia ludzkiego. Zawiera inne proteomy tkankowe jako podzbiory. Surowica krwi jest to część osocza pozbawiona fibrynogenu. Składa się w 90% z wody, 7% z białek, 3% z soli mineralnych i innych związków organicznych i nieorganicznych [1-3]. Wykorzystywana jest do przeprowadzania licznych testów diagnostycznych takich jak: badania serologiczne na wykrywanie obecności antygenów i przeciwciał w krwi, oznaczanie grupy krwi, oznaczanie stężenia glukozy we krwi, oznaczanie poziomu hormonów, enzymów i markerów nowotworowych [1-3]. Proces syntezy białek związany jest głównie z wątrobą, komórkami plazmatycznymi (γ -globuliny), oraz komórkami śródbłonna (zachodzi dzięki polirybosomom) [1-5].

W ciągu ostatnich kilkunastu lat opracowano wiele technik badawczych umożliwiających analizę całościową proteomu. W praktyce klinicznej (poszukiwanie różnic w profilach białkowych osób zdrowych i chorych) stosowane są głównie elektroforeza dwuwymiarowa (2-DE), spektrometria masowa (MS) [6-14]. Metody te umożliwiają identyfikację pojedynczych białek. W badaniach proteomu poszukuje się markerów zmian patologicznych w płynach ustrojowych takich jak: osocze, surowica, ślina, płyn mózgowo-rdzeniowy, płyn owodniowy, płyn stawowy i mocz [14-26]. W przypadku analizy proteomu tkanek i komórek badania mają swój odrębny kierunek [14,17,19,27].

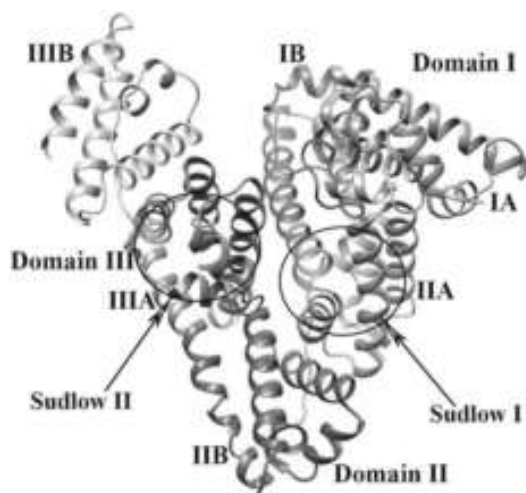
Proteinogram jest to elektroforetyczny rozdział białek surowicy na podstawowe frakcje. Elektroforeza dwuwymiarowa jest źródłem informacji o zmianach ekspresji pojedynczych białek badanych proteomów oraz ich modyfikacji [6-7,28-29]. Składa się z dwóch etapów: 1) ogniskowanie izoelektryczne - białka są rozdzielane w gradiencie pH w zależności od punktu izoelektrycznego (pI), czyli wartości pH, przy której ładunek wypadkowy białka jest równy zero [25,30-32]; 2) białka są rozdzielane zgodnie z ich masą cząsteczkową metodą SDS-PAGE (ang. SDS polyacrylamide gel electrophoresis) - proces rozdzielania elektroforetycznego w warunkach denaturujących z wykorzystaniem SDS, czyli dodecylsiarczanu sodu [7,28-29,33-35]. Elektroforeza używana jest podczas procesu diagnostycznego chorób o podłożu hematologicznym lub związanych z zaburzeniami pracy wątroby, nerek, niedoborami pokarmowymi, nowotworami czy procesami zapalnymi [36-38].

Spektrometria masowa umożliwia analizę próbek o wysokiej złożoności. Znalazła zastosowanie w badaniach proteomicznych takich jak: oddziaływania między białkami, potranslacyjne modyfikacje, mapowanie przestrzeni komórkowych [6,39-41]. Najczęściej podczas analizy proteomu stosowane są dwie techniki: MALDI oraz tandemowa spektrometria mas [6]. MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) to Desorpcja/Jonizacja laserem wspomagana matrycą. Matryca pośredniczy w przekazywaniu energii do badanej substancji. Ułatwia to jonizację próbki i umożliwia badanie substancji nielotnych, wielkocząsteczkowych, polarnych [6,28,34,42-43]. Tandemowa spektrometria mas umożliwia

oznaczenie ilościowe związków mało i średniocząsteczkowych w złożonych mieszaninach bez konieczności separacji [6,43].

1.1.2. Główne frakcje białek surowicy

Białka to najważniejsze składniki organiczne surowicy krwi. Głównymi frakcjami białek są albuminy i globuliny, które pełnią wiele istotnych funkcji w organizmie [1-4]. Albuminy to największa frakcja białek, stanowią około 60% wszystkich białek osocza/surowicy. Należą do grupy białek globularnych i tworzą III-rzędową strukturę zilustrowaną na Rys. 1. Częsteczkę albuminy ludzkiej tworzy łańcuch polipeptydowy złożony z 585 reszt aminokwasowych i 17 mostków disiarczkowych [1-5, 44-48]. Albuminy pełnią kluczową rolę w utrzymaniu ciśnienia onkotycznego (regulacja ilości wody we krwi), mają działanie buforujące pH, wykazują zdolność do wiązania ligandów (wolne kwasy tłuszczowe, wapń, niektóre hormony steroidowe, bilirubinę czy leki) oraz ich transportu [1-5, 44-48]. Naruszenie poziomu albumin w osoczu zakłóca wszelkie procesy związane z filtracją i przenikaniem wody przez ściany naczyń krwionośnych [1-2, 44-48].



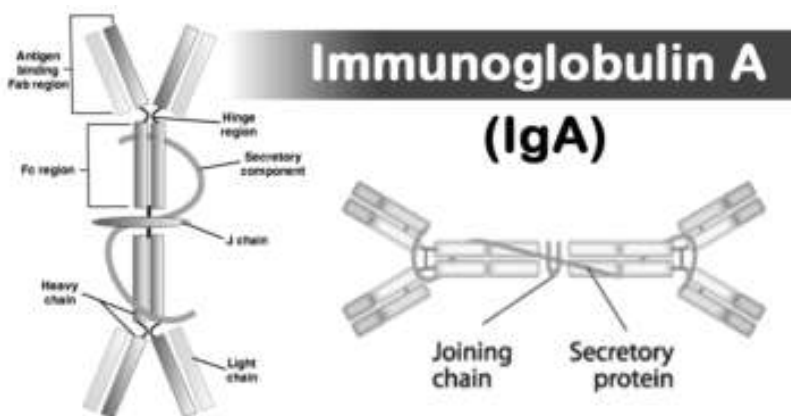
Rysunek 1 Struktura molekularna ludzkiej albuminy (HSA) reprezentująca domeny, subdomeny i miejsca wiązania Sudlowa I i II. [48]

Globuliny są odpowiedzialne za procesy odpornościowe oraz transport hormonów i kwasów tłuszczowych. Dzielimy je na kilka rodzajów [1, 4-5]:

- α 1-globuliny, których najistotniejszą funkcją jest udział w procesach obronnych organizmu, głównie w chorobach zapalnych. Wśród α 1-globulin wyróżniamy: α 1-antytrypsynę, α 1-kwaśną glikoproteinę, α -lipoproteiny oraz TBG – globulina wiążąca tyroksynę,
- α 2-globuliny pełnią wiele istotnych funkcji takich jak: są markerami zapalenia trzustki, transportują miedź, wspomagają transport żelaza, zabezpieczają nerki przed szkodliwym działaniem hemoglobiny oraz uaktywniają się w stanach zapalnych i uszkodzeniach tkanek. Do α 2-globulin zaliczamy między innymi: α 2-makroglobulinę, ceruloplazminę i haptoglobinę,
- β -globuliny głównie odpowiadają za transport żelaza, kwasów tłuszczowych i hormonów sterydowych. W tej grupie białek wyróżniamy: transferynę, hemopeksynę,

β -lipoproteinę, β 2-mikroglobulinę, czynniki krzepnięcia krwi, angiotensynę, enzymy (esterazę cholinową, fosfatazę, proteazę), bradykininę i izoaglutyniny,

- γ -globuliny tworzą immunoglobuliny i białko C-reaktywne (CRP). Immunoglobuliny możemy podzielić na pięć głównych podgrup: IgG – warunkujące odporność, IgA – występujące w wydzielinach (widoczna na rysunku 2), IgD – będące receptorami powierzchni limfocytów B, IgM – aktywujące się jako pierwsze podczas choroby, i IgE – wzrost ich liczby podczas reakcji alergicznej oraz zakażenia pasożytami. CRP to białko ostrej fazy, które uaktywnia się podczas stanów zapalnych.



Rysunek 2 Struktura immunoglobuliny IgA [49]

1.1.3. Odzwierciedlenie stanu zdrowia i zmian w fizjologii człowieka w proteomie surowicy krwi

Składniki komórkowe i biochemiczne krwi odgrywają kluczową rolę w fizjologii człowieka, a ich dynamiczne poziomy korelują ze stanem zdrowotnym osobnika. W organizmie człowieka zachodzą nieustanne zmiany fizjologiczne, które odzwierciedlają się w wynikach badań [45-46]. Ludzkie osocze/surowica zawiera różnorodne białka, wydzielane ze wszystkich typów komórek i tkanek, aby zapewnić normalne funkcje fizjologiczne [45-46]. Białka mogą być również wydzielane/wyciekające z uszkodzonych komórek czy tkanek, szczególnie podczas choroby [4]. Dynamiczny zakres stężenia białek stwarza duże wyzwanie w profilowaniu całego osocza/surowicy. Białka krążące w organizmie zmieniają się wraz z wiekiem, a także w różnych stanach fizjologicznych i patologicznych. W wielu przypadkach stanowią doskonały laboratoryjny wskaźnik stanu zdrowia. Pozwala to na wczesne wdrożenie odpowiedniego leczenia [50].

Białko całkowite we krwi to wszystkie białka jakie znajdują się w krwioobiegu. Poziom białka całkowitego stanowi wypadkową procesów syntezy i degradacji dwóch głównych frakcji białkowych: albumin i globulin [1,4-5,51]. Stężenie poniżej normy jest spowodowane przede wszystkim zmniejszeniem ilości albumin. Natomiast stężenie powyżej normy jest skutkiem zwiększonej produkcji globulin (immunoglobulin) [1,4-5,51]. We krwi krążą dodatkowo fibrynogen, glikoproteiny, lipoproteiny oraz białka, które pojawiają się okresowo w osoczu krwi z powodu choroby (np. białka ostrej fazy). Większość białek osocza syntetyzowana jest w wątrobie. Poziom białka całkowitego w badaniu biochemicznym krwi jest oznaczany podczas diagnozowania chorób wątroby, chorób nerek, chorób jelit i poważnych chorób skóry [52-54]. Zmniejszenie stężenia białka całkowitego we krwi ma związek z wieloma czynnikami, należą do nich: 1) zmniejszenie wytwarzania białek (choroby wątroby, niedożywienie, zaburzenie trawienia i wchłaniania), 2) zwiększony metabolizm białek (posocznica, choroby

nowotworowe, stany pooperacyjne, gorączka), 3) utrata białek z organizmu (krwotok, rozległe urazy, choroby nerek, utrata przez skórę – pęcherzyca, łuszczyca, oparzenie), 4) stan przewodnienia organizmu [54-56]. Zwiększenie stężenia białka całkowitego we krwi jest związane z: 1) zwiększoną produkcją przeciwciał w jednej klasie charakterystyczna dla nowotworów układu chłonnego (szpiczak mnogi, makroglobulinemia Waldenströma, choroba ciężkich łańcuchów, choroba lekkich łańcuchów), 2) zwiększona produkcja wielu klas immunoglobulin (przewlekłe stany zapalne, choroby autoimmunologiczne, przewlekłe choroby wątroby), 3) stan odwodnienia organizmu [54-56].

Bardzo dużo czynników wpływa na właściwą interpretację wyników badań laboratoryjnych. Wiąże się to z niewłaściwym przygotowaniem pacjenta do badań (posiłki, wysiłek fizyczny, przyjmowane leki), błędne pobranie materiału do badań (zbyt cienka igła, niewłaściwa probówka, brak mieszanina), niewłaściwe przechowywanie badanego materiału (silne nasłonecznienie, zbyt wysoka lub zbyt niska temperatura), niewłaściwy transport (zbyt długi czas transportu, niewłaściwe warunki przechowywania podczas transportu) [57-58]. Odpowiednie przygotowanie badanego pozwala na uzyskanie wiarygodnych wyników, które odzwierciedlają aktualny stan zdrowia [59]. Szereg parametrów oznaczanych z krwi jest związana z efektami diety badanego. Odróżnienie efektów spożycia pojedynczego posiłku od codziennej diety jest istotne [58]. Bezpośrednio po posiłku wzrasta stężenie m.in. takich parametrów jak: glukoza, fosforany czy leukocyty. Dieta bogata w białka charakteryzuje się podwyższonym poziomem: mocznika, kwasu moczowego, amoniaku. Dieta uboga w białka powoduje obniżenie: stężenia prealbuminy, białka wiążącego retinol i kreatyniny. Głodzenie się także wpływa na wyniki badań laboratoryjnych [58,60]. Podczas 48 godzinowego głodzenia dochodzi do rozwoju kwasicy metabolicznej, której towarzyszy spadek stężenia wodorowęglanów oraz wzrost stężenia związków ketonowych w surowicy krwi i moczu. Zmiany w istotnych parametrach biochemicznych pojawiają się już podczas krótkotrwałego głodzenia. Zaobserwować możemy wtedy: spadek stężenia trójglicerydów i amoniaku, insuliny, kortyzolu oraz testosteronu, natomiast wzrost stężenia wolnych kwasów tłuszczowych, glicerolu, kwasu moczowego i mocznika, a także hormonu adrenokortykotropowego [60].

Picie alkoholu, kawy czy palenie papierosów również wpływają na wyniki badań krwi [58,60]. Kofeina zawarta w kawie powoduje wzrost stężenia glukozy i wolnych kwasów tłuszczowych. Natomiast palenie papierosów zmienia poziom: leukocytów, lipoprotein, hormonów, witamin, markerów nowotworowych. Spożywanie alkoholu powoduje dwa rodzaje skutków: ostre efekty – występujące po 2-4 godzinach od spożycia, oraz efekty długotrwałego picia alkoholu [60]. Do ostrych efektów zaliczyć możemy: kwasicę metaboliczną, wzrost stężenia mleczanów i kwasu moczowego, oraz spadek stężenia glukozy [58,60]. W wyniku długotrwałego przyjmowania alkoholu obserwujemy wzrost aktywności enzymów ALT (aminotransferaza alaninowa - enzym wątrobowy), AST (aminotransferaza asparaginianowa – enzym wątrobowy) i GGTP (gamma-glutamylotranspeptydaza), a dodatkowo wzrost poziomu triglicerydów i wzrost objętości erytrocytów (efekt towarzyszący spadkowi kwasu foliowego) [54,58,60-61].

Wszelkie zioła stosowane w suplementach diety mają szerokie i różnorodne działanie dlatego ich zażywanie zawsze powinno być konsultowane z lekarzem. Zioła mogą wpływać na przemiany metaboliczne a nawet wchodzić w interakcje z lekami modyfikując ich działanie (np. obniżanie wskaźnika INR po zastosowaniu preparatów z dziurawcem, żeńszeniem) [60]. Substancje aktywne zawarte w ziołach/mieszkankach ziołowych, których dokładny skład nie zawsze jest znany, mogą prowadzić do uzyskania nieprawidłowych (zafałszowanych) wyników [60].

Wysiłek fizyczny ma istotny wpływ na wyniki badań laboratoryjnych. Podczas wysiłku fizycznego dochodzi do przesunięć płynów pomiędzy przestrzenią wewnątrznaczyniową i śródmiąższową, utraty płynów z potem i zmian stężeń hormonów (m.in.: wzrost stężenia adrenaliny, glukagonu, kortyzolu, ACTH – adrenokortykotropina) [60]. Powoduje to zmiany stężenia kreatyniny, białka całkowitego, albuminy i substancji wiążących się z albuminą takich jak wapń, bilirubina, hormony, leki. Liczba erytrocytów i leukocytów również wzrasta [58,60]. Duży wysiłek fizyczny może spowodować niedotlenienie mięśni szkieletowych, co skutkuje wzrostem stężenia mleczanów, kinazy kreatynowej, kreatyniny, mioglobiny, LDH - dehydrogenaza mleczanowa, AST -aminotransferaza asparaginianowa [58,60]. Wysiłek fizyczny uaktywnia również układ krzepnięcia, co prowadzi do skrócenia PT (czas protrombinowy) i APTT (czas częściowej tromboplastyny po aktywacji), a także do wzrostu d-dimerów (produkt rozpadu wyłącznie stabilnej, usieciowanej fibryny) [58,60].

Duże ilości białek ostrej fazy (BOF) zostają uwolnione do osocza przez szkodliwe czynniki takie jak: zakażenia bakteryjne/wirusowe (ostre infekcje), urazy mechaniczne (zranienia), urazy termiczne (oparzenia), niedokrwienia tkanek prowadzące do martwicy (np. zawał serca) [62-63]. Ich stężenie we krwi zmienia się w przebiegu stanu zapalnego. BOF zaangażowane są w mechanizmy wrodzonej odporności humoralnej. W tej grupie białek możemy wyróżnić przede wszystkim glikoproteiny, które produkowane są przez hepatocyty wątroby czyli: białko C-reaktywne (CRP), haptoglobina, fibrynogen. Cytokiny prozapalne (interleukiny IL-1, IL-6, IL-8 i czynnik martwicy nowotworów alfa - TNF- α) wzmagają produkcję białek ostrej fazy, uwalniane są przez fagocyty w trakcie wrodzonej, natychmiastowej reakcji obronnej [63]. Osoczowy profil stężenia białek ostrej fazy ulega istotnej zmianie w czasie kilku godzin od zadziałania czynnika wywołującego ostrą reakcję zapalną. Wysokie stężenie BOF w osoczu utrzymuje się nawet 2-3 tygodnie od momentu zadziałania czynnika stymulującego [63]. Wzmoczona produkcja BOF dodatknych – białko C-reaktywne, haptoglobina, ceruloplazmina, plazminogen, i inne; odbywa się kosztem obniżonej syntezy ujemnych – albuminy, transferryna, antytrombina [62]. Głównym zadaniem tych białek jest pomoc w eliminacji szkodliwych czynników i przywrócenie homeostazy organizmu [63-64]. Wykazują one różne funkcje fizjologiczne: aktywacja układu krzepnięcia, hamowanie namnażania drobnoustrojów, aglutynacja (oblepianie) patogenów, aktywacja układu dopełniacza, wiązanie i neutralizacja enzymów, wolnych rodników. BOF a zwłaszcza CRP to markery diagnostyczne aktywnego ostrego odczynu zapalnego – to markery niespecyficzne czyli nie zależą od czynnika aktywującego. Monitorowanie zmian stężenia CRP może być ważnym wskaźnikiem terapeutycznym w reumatoidalnym zapaleniu stawów [63,65], zawale serca [63], udarze mózgu [63].

1.2. Skaningowa kalorymetria różnicowa (DSC) w badaniach białek i płynów fizjologicznych

1.2.1. Klasyfikacja kalorymetrów

Kalorymetr jest przyrządem do pomiaru ciepła towarzyszącego w czasie badanej przemiany fizycznej, chemicznej lub biologicznej. W literaturze występują pojęcia: kalorymetru właściwego, układu kalorymetrycznego oraz mikrokalorymetru i nanokalorymetru [66]. Kalorymetr właściwy to naczynie kalorymetryczne wraz z umieszczonym obiektem badań i niezbędne urządzenia do przeprowadzenia przemiany, wyznaczenia ciepła przemiany, wzorcowania, a także osłona zewnętrzna o stałej lub regulowanej temperaturze. Układ

kalorymetryczny to system składający się z kalorymetru właściwego, termostatu oraz zespołu urządzeń wykorzystywanych do pomiaru, automatycznej regulacji, naboru i przetwarzania danych. Mikrokalorymetr i nanokalorymetr to odpowiednio kalorymetry umożliwiające określanie efektów cieplnych rzędu mikro- i nano- kalorii. W literaturze znajdziemy wiele sposobów sklasyfikowania kalorymetrów [66]. Biorąc pod uwagę wymianę ciepłą pomiędzy kalorymetrem właściwym i osłoną zewnętrzną wyróżnia się dwa podstawowe rodzaje kalorymetrów: adiabatyczne i nieadiabatyczne.

W badaniach próbek biologicznych coraz częściej znajdują zastosowanie: izotermiczna kalorymetria miareczkowa (ITC) i skaningowa kalorymetria różnicowa (DSC). Metoda ITC jest stosowana do otrzymywania parametrów kinetycznych determinujących wiązanie molekuł. Podczas reakcji, ciepło jest absorbowane bądź uwalniane i taki efekt jest mierzony przez czuły mikrokalorymetr podczas stopniowego miareczkowania ligandu do celi badawczej zawierającej makromolekułę. Jest to narzędzie pomocne przy projektowaniu leków i badaniu wiązań między molekułą a ligandem.

Skaningowe kalorymetry różnicowe są klasyfikowane ze względu na metodę wykorzystywaną do wyznaczenia efektów cieplnych. Wyróżniamy metodę:

- przepływu ciepła
- kompensacyjną.

Każda z tych metod ma inne rozwiązanie konstrukcyjne [67-70].

Różnicowe kalorymetry typu przepływowego posiadają dwa symetryczne, jednakowe naczynka pomiarowe (S- próba i R- referencja) we wspólnym piecu. Temperatura pieca jest regulowana w sposób niezależny od zmian właściwości próbek w czasie pomiaru, zgodnie z programem temperaturowym. Mierzona jest różnica temperatur między próbkami:

$$\Delta T = T_S - T_R \quad (1)$$

Gdy do obu próbek płynie taki sam strumień ciepła, wtedy różnica temperatur wynosi zero. Stan równowagi może zostać zakłócony przez przemianę w próbce albo podczas asymetrii cieplnej układu spowodowanej różnicą pojemności cieplnych próbek. W takim wypadku obserwujemy różnicę temperatur $\Delta T \neq 0$, która jest proporcjonalna do różnicy strumieni cieplnych

$$\Delta \Phi_m = -k' * \Delta T \quad (2)$$

Stała proporcjonalności k' będąca funkcją temperatury wyznaczana jest doświadczalnie.

System pomiarowy różnicowych kalorymetrów skaningowych typu kompensacyjnego jest złożony z dwóch identycznych mikropieców, w których umieszczone są próbki S i R, wyposażonych w grzejniki elektryczne, oddzielonych od siebie i umieszczonych w osłonie o stałej lub zmiennej temperaturze.

Podczas pomiaru do grzejników obu pieców dostarczana jest taka moc, żeby zmieniać ich temperaturę zgodnie z założoną szybkością ogrzewania. Gdy temperatura obu pieców jest jednakowa i różnica mocy dostarczanej do grzejników wynosi zero to występuje symetria cieplna układu. Asymetria wywoływana przemianą próbki lub różnicą pojemności cieplnej próbek S i R generuje różnicę temperatur między piecami. Układ pomiarowy stara się

sprowadzić ją do zera czyli skompensować odpowiednią zmianą mocy elektrycznej dostarczanej do grzejnika pieca próbki [68]. Moc jest przekształcana w pozorną molową nadmiarową pojemność cieplną $\langle \Delta C_p \rangle$ zgodnie ze wzorem [68]:

$$\langle \Delta C_p \rangle = \frac{P}{\sigma m} \quad (3)$$

gdzie: P – moc potrzebna do utrzymania zerowej różnicy temperatur

$\sigma = dT/dt$ - szybkość skanowania,

m – ilość moli białka w objętości próbki.

1.2.2. Informacje o technice i krzywych DSC białek

Skaningowa kalorymetria różnicowa pozwala mierzyć właściwości termodynamiczne przemian wywoływanych termicznie. Stosowana jest do badania różnych makrocząsteczek biologicznych takich jak białka czy lipidy [71-80]. Wśród przykładów zastosowań wymienić można badania: stanów konformacyjnych białek [73], wiązań DNA z białkiem [81], topienia biopolimerów, przejść fazowych lipidów oraz interakcji lipid-białko [71,82].

Pojemność cieplna odzwierciedla zdolność substancji do absorpcji ciepła. W warunkach izobarycznych:

$$C_p = \left(\frac{dq}{dT} \right)_p \quad (4)$$

Na poziomie molekularnym energia cieplna będzie rozdzielona pomiędzy dostępnymi stopniami swobody i podzielona na energie kinetyczne (drgania, ruchy obrotowe, translacje) lub energię potencjalną (zmiany międzycząsteczkowe energii potencjalnych: rozciąganie wiązań, zginanie, złamanie itp.) [83].

C_p można wyznaczyć z temperaturowych zmian entalpii H:

$$C_p = \frac{dH}{dT} \quad (5)$$

Wartość pojemności cieplnej zależy od ilości dróg rozprzestrzeniania przyjmowanego przez układ ciepła, więc jest ona powiązana z entropią S:

$$C_p = T \frac{dS}{dT} \quad (6)$$

Entalpia (H) jest jednoznaczłą funkcją stanu, czyli jej zmiana jest jednoznacznie określona wartościami parametrów stanu układu na początku procesu i po jego zakończeniu niezależnie od drogi. Pochodna entalpii względem temperatury jest równa pojemności cieplnej pod stałym ciśnieniem. Pozwala to określić zmianę entalpii :

$$\Delta H(T) = \int_{T_0}^T \Delta C_p dT \quad (7)$$

Funkcja stanu zwana entropią określa kierunek przebiegu procesów spontanicznych w odosobnionym układzie termodynamicznym. Gdy mamy do czynienia z procesem odwracalnym kierunek przepływu energii może zostać zmieniony w każdym momencie przez zmianę warunków. W przypadku procesu nieodwracalnego kierunek przepływu energii nie może zostać zmieniony. Zmiana entropii (ΔS):

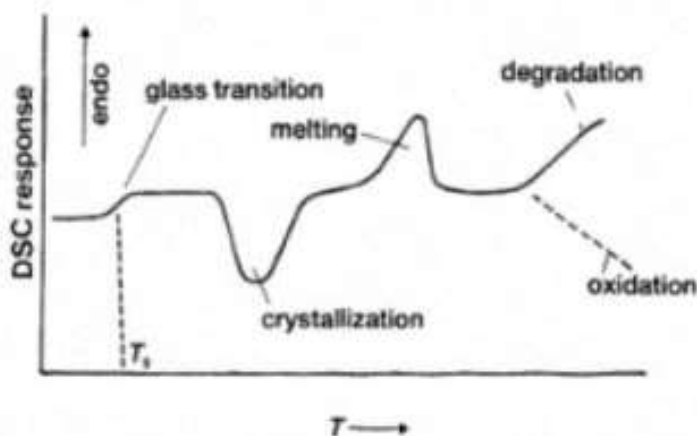
$$\Delta S(T) = \int_{T_0}^T \frac{\Delta C_p}{T} dT \quad (8)$$

Energia swobodna Gibbsa (ΔG) (entalpia swobodna) jest miarą ilości energii, która może być zamieniona w pracę w tym układzie. Zmiana energii swobodnej Gibbsa podczas reakcji dostarcza użytecznych informacji o spontaniczności reakcji. ΔG może być obliczona na podstawie zestawu parametrów takich jak zmiana entalpii i entropii, oraz temperatury w której zachodzi reakcja.

$$\Delta G(T) = \Delta H(T) - T\Delta S(T) \quad (9)$$

Parametry takie jak ΔG i ΔH dostarczają informacji na temat stabilności cieplnej białek [81]. Stabilność ma ogromne znaczenie w zrozumieniu funkcji białek. Metodą DSC możemy badać stabilność termodynamiczną białek oraz stabilność kinetyczną białek [84].

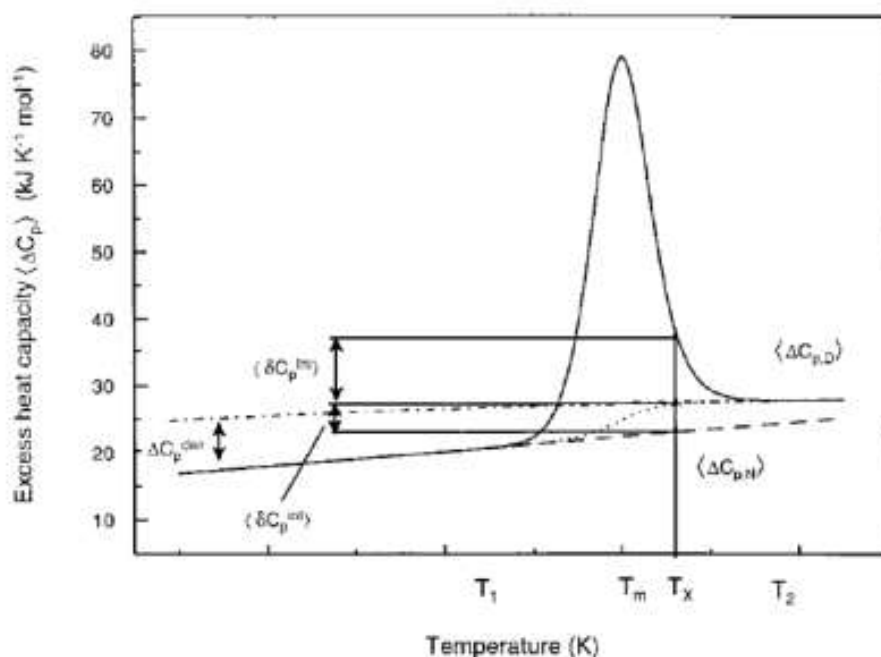
Rysunek 3 przedstawia krzywą dla typowego organicznego polimeru. Krzywa DSC polimeru charakteryzuje się kilkoma typowymi efektami termicznymi: temperaturą zeszklenia, krystalizacją, topnieniem, utlenieniem/degradacją [85]. Obserwujemy na krzywej przejście szkliste, gdy ciało/substancja przechodzi w stan amorficzny w temperaturze T_g czyli temperaturze zeszklenia. Możemy zobaczyć również krystalizację czyli organizację atomów, cząsteczek w dobrze określonej, sztywnej sieć krystaliczną ze stanu ciekłego, amorficznego w krystaliczny. Jest to proces egzotermiczny – energia uwalniania jest z układu. Kolejno możemy obserwować szeroki pik odpowiadający topnieniu czyli przemianie fazowej ze stanu stałego, krystalicznego w ciekły – proces endoenergetyczny – energia jest pobierana przez układ. Na koniec możemy zaobserwować utlenienie/degradację czyli zniszczenie struktury badanej substancji.



Rysunek 3 Krzywa DSC dla typowego organicznego polimeru, gdzie: T_g – temperatura zeszklenia, Glass transition – przejście szkliste, Crystallization – Krystalizacja, Melting – topnienie, Degradation – degradacja, Oxidation - utlenianie [85]

Procesowi przejścia białka z formy natywnej do zdenaturowanej towarzyszą efekty cieplne. Technika DSC pozwala na bezpośredni pomiar tych efektów. Mikrokalorymetr pozwala mierzyć różnicę pojemności cieplnej między roztworem białka a rozpuszczalnikiem. Możemy wyznaczyć cząstkowe właściwe pojemności cieplne białka. W związku z niewielkimi stężeniami białka stosowanymi w mikrokalorymetrii, pozorne molowe pojemności cieplne prezentowane są jako cząstkowe molowe pojemności cieplne [86].

Krzywa DSC białka przedstawia zmiany pojemności cieplnej C_p w funkcji temperatury. Typową krzywą DSC procesu termicznej denaturacji białka zilustrowano na Rysunku 4. W wyniku rozwijania białka pod wpływem temperatury na krzywej możemy wyróżnić trzy główne obszary. Obszar niskotemperaturowy - pojemność zmienia się ze wzrostem temperatury, najczęściej liniowo. Obszar endotermicznego przejścia fazowego czyli piki – gdy pojemność cieplna gwałtownie rośnie. Trzecim jest obszar wysokotemperaturowy za przejściem, w którym zmiany pojemności cieplnej nie są liniowe. Czasami w tym zakresie temperatur ujawniają się wkłady egzotermiczne związane z agregacją rozfałdowanych łańcuchów polipeptydowych białek.



Rysunek 4 Typowa krzywa DSC białka poddanego termicznej denaturacji, gdzie T_1 do T_2 zakres temperatur procesu, T_m to temperatura przejścia związana z denaturacją białek, $\langle C_{p,N} \rangle$ to cząstkowa molowa pojemność cieplna białka natywnego, przybliżenie $\langle C_{p,N} \rangle$ funkcją liniową – linia przerywana, $\langle C_{p,D} \rangle$ to cząstkowa molowa pojemność cieplna białka zdenaturowanego, przybliżenie $\langle C_{p,D} \rangle$ funkcją kwadratową (zazwyczaj wielomian) – linia kreska-kropka, ΔC_p^{den} to zmiana pojemności cieplnej, $\langle \delta C_{p,\text{int}} \rangle$ jest to wewnętrzna nadmiarowa pojemność cieplna i wyznaczana w wyniku ekstrapolacji funkcji $\langle C_{p,N}(T) \rangle$ i $\langle C_{p,D}(T) \rangle$ obszaru pomiędzy temperaturami T_1 i T_2 proporcjonalnie do postępu przejścia – linia kropkowana, $\langle \delta C_{p,\text{trs}} \rangle$ to nadmiarowa pojemność cieplna przejścia, T_x – temperatura dla której wyznaczono składowe [87].

Na przykładowej krzywej DSC białka pokazanej na rysunku 4, proces denaturacji obserwujemy w zakresie temperatur T_1 do T_2 . T_m jest to temperatura przejścia, w której występuje maksimum w $\langle \Delta C_p \rangle$. $\langle C_{p,N} \rangle$ jest cząstkową molową pojemnością cieplną natywnego białka i można ją przybliżyć funkcją liniową – na rysunku 4 przybliżenie przy pomocy linii przerywanej. $\langle C_{p,D} \rangle$ jest cząstkową molową pojemnością cieplną białka zdenaturowanego i można go przybliżyć funkcją potęgową np. kwadratową – na rysunku 4 przy pomocy linii kreska-kropka. $\Delta C_p^{\text{den}} = \langle C_{p,D}(T) \rangle - \langle C_{p,N}(T) \rangle$ to zmiana pojemności cieplnej, która towarzyszy denaturacji. Zmiana ta jest zazwyczaj dodatnia, ponieważ białko zdenaturowane ma większą pojemność cieplną niż natywne [87].

Nadmiarowa pojemność cieplna białka może być podzielona na dwie składowe:

$$< \Delta C_p > = < \partial C_p^{int} > + < \partial C_p^{trs} > \quad (10)$$

$< \delta C_p^{int} >$ jest to wewnętrzna nadmiarowa pojemność cieplna i stanowi sumę wkładów od wszystkich stanów obecnych podczas przejścia ze stanu natywnego do zdenaturowanego.

$< \delta C_p^{trs} >$ nazywana nadmiarową pojemnością cieplną przejścia i ma swoje źródło we wzroście fluktuacji układu, gdy białko przechodzi pomiędzy stanami o różnej entalpii w trakcie termicznej denaturacji. Zwykle ta składowa jest większa niż $< \delta C_p^{int} >$ co widzimy na rys. 4 przy temperaturze oznaczonej jako T_x .

$< \delta C_p^{int} >$ można wyznaczyć poprzez wykonanie ekstrapolacji funkcji $< C_{p,N}(T) >$ i $< C_{p,D}(T) >$ do obszaru pomiędzy temperaturami T_1 i T_2 proporcjonalnie do postępu przejścia – linia kropkowana na rysunku 4.

Polem pod funkcją nadmiarowej pojemności cieplnej przejścia ($< \delta C_p^{trs} >$) jest ΔH_{den} czyli nadmiarowa entalpia termicznej denaturacji:

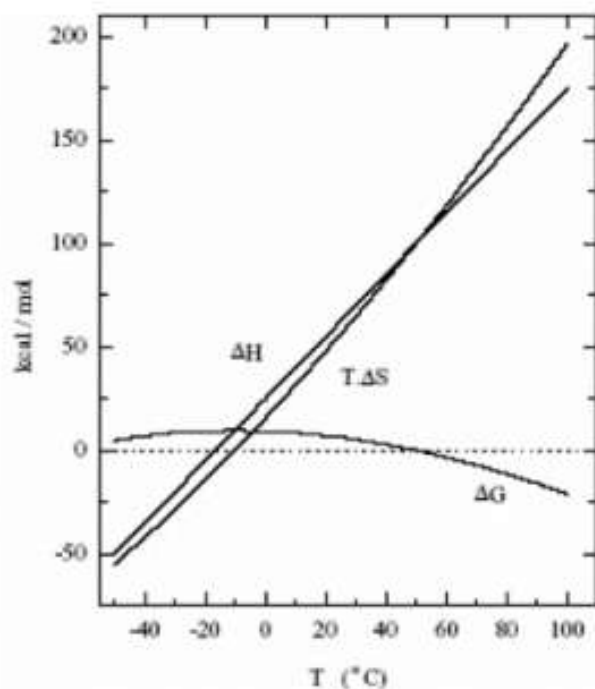
$$\Delta H_{den} = \int_{T_1}^{T_2} < \partial C_p^{trs} > dT \quad (11)$$

T_1 i T_2 to temperatury, w których zakresie całkujemy – jest to pole piku nad linią kropkowaną na rysunku 4. W ten sposób wyznaczana jest zmiana entalpii czyli entalpia kalorymetryczna przejścia ΔH_{cal} .

Natomiast nadmiarowa entropia denaturacji (ΔS_{den}) jest wyznaczana ze wzoru:

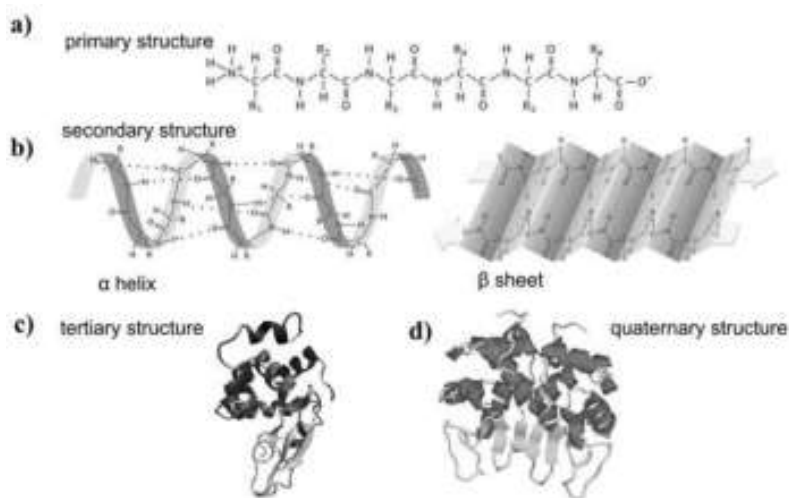
$$\Delta S_{den} = \int_{T_1}^{T_2} < \partial C_p^{trs} > d \ln T \quad (12)$$

Termodynamiczną stabilność białka, graficznie można przedstawić za pomocą krzywej stabilności – rysunek 5. Wartości zmian entalpii oraz entropii, zatem także ΔG można uzyskać bezpośrednio z pomiarów kalorymetrycznych. Monomeryczne białka, które ulegają rozfałdowaniu według modelu dwustanowego ($N \xrightleftharpoons{K} U$, gdzie: N – forma natywna białka, U – rozfałdowana forma białka, K – stała równowagi) posiadają dwa punkty przecięcia krzywej reprezentującej zmiany ΔG ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$) z osią x (zmiany temperatury T). Punkty te nazywane są punktami przejścia. Dla białek monomerycznych punkty przejścia odpowiadają temperaturom, gdzie stężenia białka w formie natywnej i rozfałdowanej są takie same. Punkt w zakresie niskich temperatur jest wynikiem ekstrapolacji i przewiduje niestabilność białka w procesie zwanym zimną denaturacją.



Rysunek 5 Krzywe stabilności przedstawiające zmiany parametrów termodynamicznych podczas denaturacji typowego białka globularnego [88]

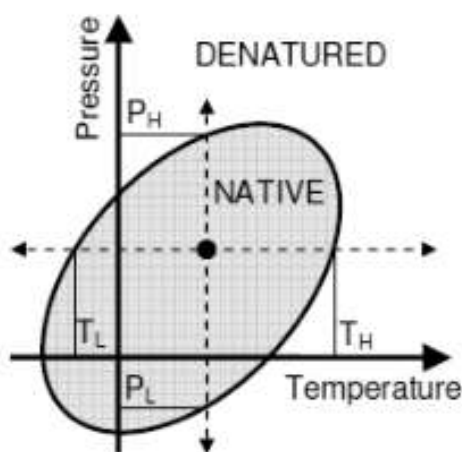
Denaturacja białek jest zaburzeniem struktury cząsteczek białkowych związanych z rozerwaniem wiązań chemicznych stabilizujących ich strukturę drugo-, trzecio- i czwartorzędową. Rysunek 6 przedstawia hierarchiczną strukturę białek. W efekcie odsłonięcia ulegają pewne grupy funkcyjne, głównie $-SH$ i $-OH$, które w stanie natywnym były związane wiązaniami wodorowymi. Struktura pierwszorzędowa nie ulega zmianie. Denaturacja może być zarówno procesem endoenergetycznym jak i egzoenergetycznym.



Rysunek 6 Struktura rzędowa białek: a - struktura pierwszorzędowa, b – struktura drugorzędowa, c – struktura trzeciorzędowa, d- struktura czwartorzędowa [89]

Proces denaturacji zachodzi pod wpływem czynników fizycznych i chemicznych. Czynnikiem fizycznym powodującą denaturację są: temperatura, ciśnienie, promieniowanie jonizujące i niejonizujące, naprężenie mechaniczne, mieszanie i wysychanie. Denaturację chemiczną powodują takie substancje jak: stężone sole i zasady, sole metali ciężkich, detergenty oraz rozpuszczalniki organiczne.

Zaprezentowany na Rysunku 7 diagram fazowy (przewidziany teorią Hawley'a) w płaszczyznach temperatura-ciśnienie pokazuje, że natywny stan białek jest stabilny w ograniczonym zakresie temperatury i ciśnienia. Zgodnie z teorią Hawley'a T_H oraz T_L odpowiadają wysokiej i niskiej temperaturze denaturacji, natomiast p_H i p_L to wysokie i niskie ciśnienie, umożliwia to denaturację izotermiczną przez zmianę ciśnienia. Teoria Hawley'a oparta jest na dwóch hipotezach: 1) białka mają tylko dwa różne stany: zwinięty i rozfałdowany; 2) równowaga termodynamiczna utrzymuje się podczas procesu denaturacji – cały proces jest odwracalny [90].



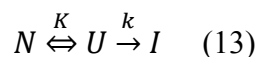
Rysunek 7 Obraz poglądowy teorii stabilności Hawley'a [90]

Jak wspomniano przy omawianiu krzywej stabilności zilustrowanej na Rysunku 5, białka mogą ulegać denaturacji nie tylko w wysokich temperaturach, ale także w wyniku obniżania temperatury (tak zwana zimna denaturacja) [91-93]. Proces termicznej denaturacji w wysokich temperaturach polega na zrywaniu wiązań wodorowych i wzmacnianiu oddziaływań hydrofobowych. Dalsze ogrzewanie kooperatywnych wiązań wodorowych stabilizujących strukturę helikalną powoduje ich łamanie. Grupy hydrofobowe zostają wystawione na działanie rozpuszczalnika w wyniku rozfałdowania struktury białka. Prowadzi to do w konsekwencji także do agregacji i wytrącania białka (koagulacji). Wszystkie białka ulegają denaturacji w podobnym zakresie temperatur, ale ich profile przejść termicznych są zróżnicowane. Zimna denaturacja to wynik obniżania potencjału termodynamicznego hydratacji wraz z obniżeniem temperatury. Jest to korzystne termodynamicznie, a hydratacja grup polarnych jest odpowiedzialna za zimną denaturację. Zimna denaturacja jest całkowicie odwracalna [1,91-93].

Denaturacja może być procesem odwracalnym, gdy czynnik zostanie usunięty (np. oddzielenie mocznika podczas dializy). Wtedy wiele białek powraca do natywnej konformacji. Ta forma procesu musi być przeprowadzana bardzo powoli. Dane eksperymentalne otrzymane z procesu odwracalnego można opracować w ramach termodynamiki równowagowej. Gdy cząsteczka białka nie może powrócić do konformacji natywnej mamy do czynienia

z denaturacją nieodwracalną. Proces nieodwracalny jest zależny od szybkości skanowania i w opracowaniu stosujemy podejście kinetyczne.

Denaturacja termiczna białek jest często przemianą kontrolowaną czynnikiem kinetycznym. Uwzględniając aspekty kinetyczne proces denaturacji białek może być opisany modelem Lumry'ego i Eyringa (L-E) [94-95] :



gdzie: N – forma natywna białka, U – forma rozfałdowana, I - forma nieodwracalnie zdenaturowana, K – stała równowagi pomiędzy stanami N i U, k – stała szybkości dla procesu nieodwracalnego. W niektórych przypadkach model L-E może zostać zredukowany do jednokrokowego prostego modelu nieodwracalnego, a czasami do poprawnego opisu należy zastosować bardziej złożone modele. Opisano wiele modyfikacji modelu L-E [94-96].

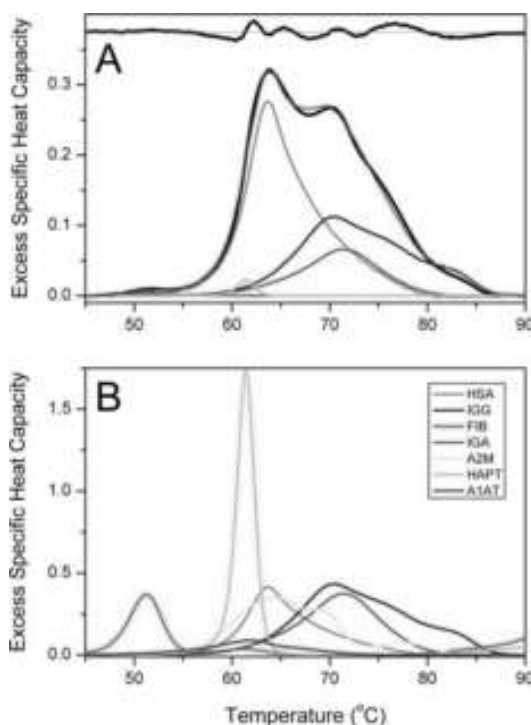
Na zjawisko denaturacji często nakłada się zjawisko agregacji białek, które powoduje emitowanie ciepła (jest to najczęściej proces egzotermiczny). Taką agregację może reprezentować drugi człon równania (13) – wkład kinetyczny opisany stałą szybkości k. Agregacja białek jest niespecyficznym łączeniem się molekuł białek w bezpostaciowe skupiska (agregaty) lub włókienka amyloidowe (agregaty białkowe o strukturze β) [97-100]. Do agregacji, a nawet wytrącania po rozfałdowaniu dochodzi przy wysokich stężeniach próbki czy starych próbkach. W takiej sytuacji zjawisko agregacji zaburza dokładne wyznaczenie entalpii z pomiarów DSC, powoduje zmianę kształtu piku reprezentującego przejście denaturacji białka oraz przesunięcie jego maksimum w kierunku niższych temperatur.

1.2.3. Zastosowanie metody DSC w diagnostyce medycznej

Śledząc doniesienia literaturowe z ostatniego dwudziestolecia, można stwierdzić, że różnicowa kalorymetria skaningowa jest przyszłościową techniką w diagnostyce medycznej, przeprowadzono wiele badań osocza/surowicy i innych płynów fizjologicznych w celu klinicznego rozpoznania i monitorowania chorób [73-80,101-114]. Biorąc pod uwagę wysoką czułość DSC na zmiany w interakcjach wewnątrz- i międzycząsteczkowych warunkujących stabilizację biomolekuł, prawdopodobne jest, że profile DSC biopłynów mogą odzwierciedlać zmodyfikowaną stabilność termiczną głównych składników proteomu m.in. z powodu wiązania biomarkerów związanych z chorobą [110]. Gdy struktury biologiczne ulegają przekształceniu to ich właściwości termodynamiczne również będą się zmieniać, dzięki czemu można monitorować przemiany w strukturze molekularnej próbek biologicznych.

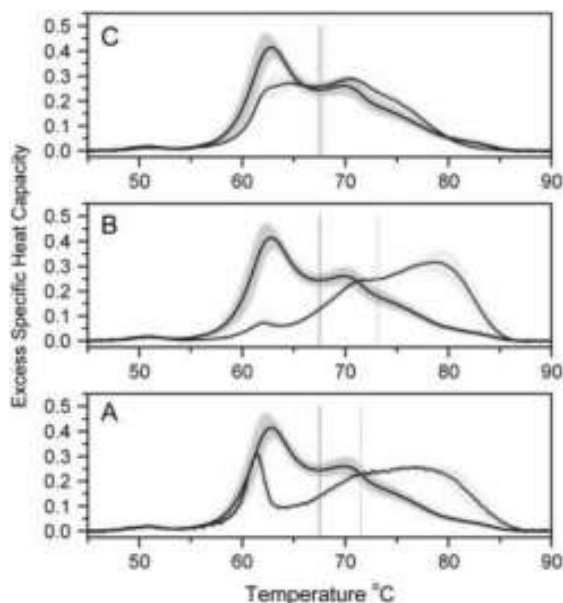
Do jednych z pierwszych, ciekawych wyników ze wspomnianego obszaru badań należą te opublikowane przez zespół N. Garbett z University of Louisville Health Sciences Center w USA [101-103]. Początkowe doniesienia dotyczyły porównań mało licznych grup pacjentów z odpowiednimi grupami kontrolnymi. W kolejnych latach zaprezentowano wyniki uzyskane w oparciu o duże próby. Rysunek 8 panel A przedstawia uśrednione profile DSC osocza krwi 120 zdrowych osób [102]. Z rysunku tego wynika, że uwzględnienie wkładu (w odpowiednich proporcjach) od zaledwie pięciu, najobficiej występujących w osoczu białek (HSA, IgG, fibrynogen, immunoglobulina A i haptoglobina) daje dobre dopasowanie do eksperymentalnie uzyskanej krzywej. Oprócz osób zdrowych badaniom poddano grupę pacjentów z toczniem rumieniowatym – średnia z 297 próbek osocza uzyskanych z Rejestru i Repozytorium Rodziny tocznia na rysunku 7A w [102]. Przedstawiona na tym rysunku dekonwolucja średniej krzywej

dla osób z toczniem pokazuje, że zmieniony kształt wynika w dużym stopniu ze zmiany denaturacji HSA [102]. Profile DSC wykazują wrażliwość na zmiany w proteomie osocza, które korelują ze stanem klinicznym badanych osób. Połączenie techniki DSC z nowoczesnymi metodami diagnostycznymi może zapewnić kompleksowe narzędzie do analizy próbek biologicznych i diagnostyki pacjentów. W artykule opublikowanym w *Methods* w 2015 roku [102], opisano zasady, praktykę i wyzwania związane z analizą krzywych DSC osocza krwi osób zdrowych i chorych.



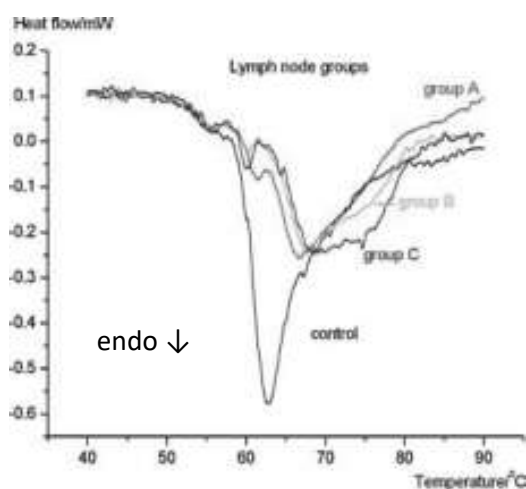
Rysunek 8(A) Czarna krzywa - średnia - uzyskana ze 120 próbek osocza zdrowych osób. Czerwona krzywa jest wynikiem dekonwolucji obejmującej pięć występujących w dużej ilości białek osocza. W górnej części panelu jest pokazany wykres resztkowy (krzywa obserwowana minus dopasowanie). (B) Krzywe DSC siedmiu najobficiej występujących białek w osoczu: HSA - albumina surowicy ludzkiej, IGG – immunoglobulina G, FIB – fibrynogen, IGA – immunoglobulina A, A2M – alfa-2-makroglobulina, HAPT – haptoglobina, A1AT – alfa-1-antytrypsyna [102].

Rysunek 9 przedstawia porównanie krzywych osób zdrowych z chorymi na wybrane schorzenia – toczeń, borelioza, reumatoidalne zapalenie stawów. Pionowe linie przedstawiają pierwszy moment przejścia (kolor różowy - dla osób zdrowych, niebieski - w przypadku choroby). W przypadku toczenia (rys. 9 panel A) pierwszy moment przesuwają się od normalnej wartości 67,5°C do wartości 71,5°C. Profil osób z boreliozą (rys. 9 panel B) różni się od tego widocznego dla toczenia układowego i pierwszy moment jest przy 73,15°C. Krzywa osób cierpiących na reumatoidalne zapalenie stawów (rys. 9 panel C) charakteryzuje się pierwszym momentem przy 67,9°C, który jest nieznacznie wyższy niż dla osób zdrowych, ale przejście z wyraźnymi zmianami kształtu. Różnica w krzywych DSC między osobami zdrowymi a chorymi może być spowodowana m.in. interakcjami biomarkerów z głównymi białkami osocza/surowicy [103].



Rysunek 9 Porównanie profili DSC osocza osób zdrowych (różowa krzywa) z osobami chorymi na wybrane schorzenia (niebieska): A - toczeń układowy, B – borelioza, C - reumatoidalne zapalenie stawów, pionowe linie przedstawiają pierwszy moment przejścia różowy dla osób zdrowych i niebieski w przypadku choroby [103].

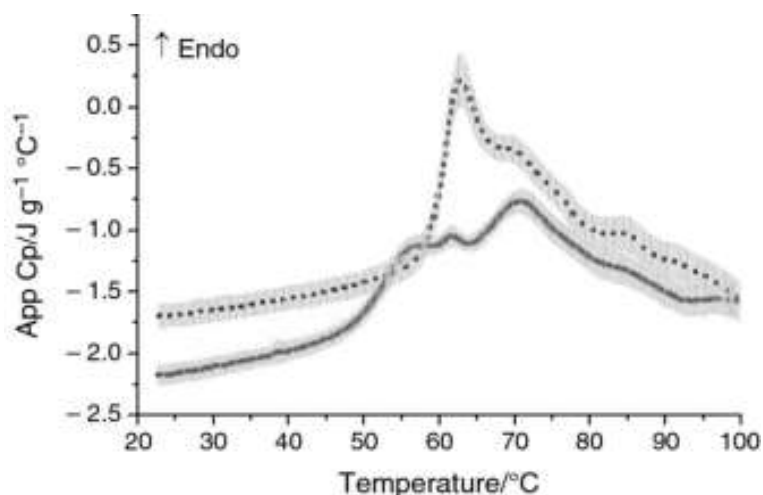
Wiele ośrodków na świecie (Węgry [79,115], Gruzja [116-118], Francja [119-120], Bułgaria [104,121-122]) zajmuje się badaniami DSC osób z różnymi nowotworami. Kalorymetryczne badania wykazują charakterystyczne i powtarzające się przemiany termiczne widoczne na krzywej DSC u pacjentów chorych na określony rodzaj nowotworu (raka piersi [79]– rysunek 10 [116-117,122,126], [115] praca odnośnie pacjentów z rakiem skóry, piersi, guzem trzustki, nowotwory mózgu [119-120], rak jelita grubego [104], badanie linii komórkowych nowotworów [121]). Pomiar DSC może również być pomocny do rozróżnienia różnych etapów choroby i monitorowania stadium choroby lub efektów zastosowanej terapii [79-80,101,111-112].



Rysunek 10 Krzywe DSC ludzkiego osocza u zdrowych osób z grupy kontrolnej, u pacjentek z rakiem piersi z przerzutami lub bez węzłów chłonnych. Krzywe skierowane na dół reprezentują proces endotermiczny (Grupa A: bez węzłów chłonnych z przerzutami; Grupa B: 1–3 węzły chłonne z przerzutami, węzły wartownicze pozytywne; Grupa C: 4–10 węzłów chłonnych z przerzutami). [79]

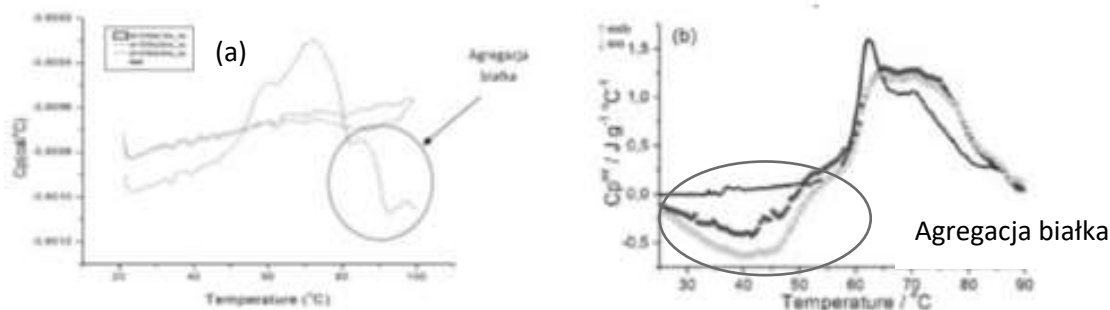
Oprócz badań osocza i surowicy krwi możemy znaleźć prace dotyczące innych płynów i tkanek biologicznych – łąkotki [123], płynu stawowego [105,124-125], płynu mózgowo-rdzeniowego [77-78], śluzówki jelita cienkiego [74].

Prześledzenie opublikowanych prac pozwala wnioskować, że osocze/surowica krwi od osób zdrowych daje charakterystyczny kształt krzywej DSC. Na kształt obserwowanego przejścia endotermicznego oprócz występujących białek w surowicy/osoczu krwi może mieć jednak wpływ wiele czynników zewnętrznych czy fizykochemicznych. Takim czynnikiem jest na przykład rodzaj użytego rozpuszczalnika do przygotowania roztworów badanej substancji. Zarówno dla roztworów wodnych jak i buforowych denaturacja przebiega w podobnym zakresie temperaturowym, jednak kształt krzywych różni się [126] – rysunek 11. Zauważalna jest różnica w kształcie przejścia, oraz przesunięcie w stosunku do osi pojemności cieplnej.



Rysunek 11 Uśrednione krzywe DSC dla roztworów surowicy krwi tej samej grupy osób: w buforze o pH=7,4 (czarna przerywana krzywa) oraz w wodzie (niebieska krzywa) [126]; cienie reprezentują odchylenie standardowe

Kształt przejścia endotermicznego związanego z procesem rozfałdowania białek może być modyfikowany przez agregację, która występuje równocześnie lub już po zniszczeniu ich struktury przestrzennej – rysunek 12. Może mieć ona miejsce także wtedy, gdy badana próbka była długo przechowywana, ponieważ jest ona wówczas bardziej podatna na powstawanie agregatów.



Rysunek 12 Krzywe DSC (a) efekt agregacji po termicznym rozfałdowaniu (surowe wyniki, pomiar własny), (b) przykład agregacji występującej równocześnie z rozfałdowaniem dla krzywych po ekspozycji surowicy na promieniowanie X, wyjściowa - czarna krzywa, kontrolna - niebieska krzywa, napromieniowana - krzywa czerwone otwarte kółka [127]

1.3. Trening w sportach siłowych i wytrzymałościowych

1.3.1. Fizjologia wysiłku fizycznego

Wysiłek fizyczny definiowany jest jako praca mięśni szkieletowych wraz z całym zespołem towarzyszących jej czynnościowych zmian w organizmie. Praca mięśni szkieletowych polega na kurczeniu się i rozkurczaniu. Skurcze pobudzane są przez impulsy nerwowe, które poprzez włókna nerwów ruchowych docierają do mięśni. W mięśniu impuls nerwowy sprawia, że następuje wzrost stężenia jonów wapniowych w cytoplazmie komórkowej mięśnia. Powoduje to aktywację trzech procesów: 1) rozpadu ATP, który dostarcza energię, 2) skrócenie komórek mięśniowych i 3) glikolizę, która rozpoczyna cykl przemian potrzebnych do dostarczenia energii na odbudowę ATP [45].

Adenozynotrójfosforan (ATP) to powszechnie występujący wysokoenergetyczny fosforan. Tworzą go nukleozyd i adenozyny, do których przyczepiają się wiązaniami wysokoenergetycznymi trzy cząsteczki fosforanu. Usunięcie fosforanu z cząsteczki ATP, powoduje wytworzenie energii, umożliwiając ruch mięśni, syntezę cząsteczek i ich transport wbrew gradientowi stężeń oraz wydalenie [45-46,128-130]. Dodatkowym nośnikiem energii w mięśniach jest adenozynodifosforan ADP. Przewyższa on stężenie ATP w organizmie. Powstaje w wyniku przeniesienia reszty fosforanowej z ATP na kreatynę.

Do pracy mięśni potrzebne są: fosfokreatyna, glikogen mięśniowy, glukoza we krwi i wolne kwasy tłuszczowe [128]. Rozróżniamy w zależności od czasu trwania treningu dwa rodzaje przemian energetycznych: metabolizm tlenowy i beztlenowy. Oba systemy nie wykluczają się i mogą działać jednocześnie. Procesy tlenowe polegają na utlenianiu składników pokarmowych w mitochondriach w celu dostarczenia energii. Glukoza, kwasy tłuszczowe i aminokwasy łączą się z tlenem, aby uwolnić znaczne ilości energii użytej w celu zamiany AMP (adenozynomonofosforan) i ADP (Adenozyno-5'-difosforan) w ATP. Procesy beztlenowe przebiegają na drodze rozpadu ATP, fosfokreatyny (PC) oraz glikolizy beztlenowej [45-46,128-130].

Głównym wskaźnikiem funkcji zaopatrzenia tlenowego jest pułap tlenowy (VO_{2max}). Wskaźnik ten informuje o maksymalnej ilości tlenu, która może być pobrana podczas maksymalnego wysiłku z powietrza atmosferycznego i przetransportowana z pęcherzyków płucnych do mięśni [131]. Pułap tlenowy określa wydolność tlenową (wydolność aerobową) [132].

1.3.2. Różnice pomiędzy wysiłkiem siłowym i wytrzymałościowym

Ćwiczenia siłowe mają charakter treningu beztlenowego (anaerobowego), którego istotą jest wielokrotne powtarzanie określonych ruchów. Skurcz mięśni podczas tych ruchów ma przełamywać opór. W efekcie takich ćwiczeń dochodzi do przerostu określonych grup mięśni oraz zmian proporcji włókien białych i czerwonych. W ten sposób trenowane grupy mięśni zwiększają swoją maksymalną siłę skurczu [129,132-134].

Trening wytrzymałościowy ma za zadanie poprawę wszystkich funkcji organizmu odpowiedzialnych za optymalny przebieg procesów odżywiania i dotleniania tkanek w czasie wysiłku fizycznego. Determinuje to zdolność do długotrwałego wysiłku fizycznego serca, układu naczyniowego, układu oddechowego, co polepsza też zdolność transportu tlenu przez

krę. Każdy kolejny dzień stosowania takiego treningu powoduje usprawnienie tych funkcji, i możliwe jest wydłużenie wysiłku fizycznego w granicach dopuszczalnego progu częstości skurczów serca (75% HR max). Wynikiem długotrwałego stosowania treningu wytrzymałościowego jest przebudowa tkanki mięśniowej zaangażowanej w ćwiczenia i przerost tkanki mięśniowej. Te procesy w przypadku treningu wytrzymałościowego są mniej nasilone niż w wyniku treningu siłowego. Jest wiele korzyści dla stanu zdrowia spowodowanych treningiem wytrzymałościowym. Natomiast jego całkowite zaprzestanie po wieloletnich ćwiczeniach może doprowadzić do powstania zaburzeń metabolicznych, nadwagi czy otyłości [129,132-134].

Za jeden z najbardziej wymagających sportów wytrzymałościowych uznawane jest narciarstwo biegowe. Podczas treningu angażowana jest większość mięśni ludzkiego organizmu. Narty używane w narciarstwie biegowym posiadają system wiązań z wolną piętą. Używane narty są lekkie i wąskie, co ułatwia manewrowanie nimi. Istnieją dwie techniki uprawiania narciarstwa biegowego, technika klasyczna i technika dowolna inaczej nazywana łyżwową [135-139].

Klasyczny krok polega na przesuwaniu jednej stopy bezpośrednio do przodu, a następnie drugiej stopy i naprzemiennym używaniu kijów. Ręce przesuwane są ukośnie do nóg, żargonowo nazywano „krokiem po przekątnej” [140]. Rysunek 13 przedstawia sportowców stosujących technikę klasyczną.



Rysunek 13 Krok klasyczny [140]

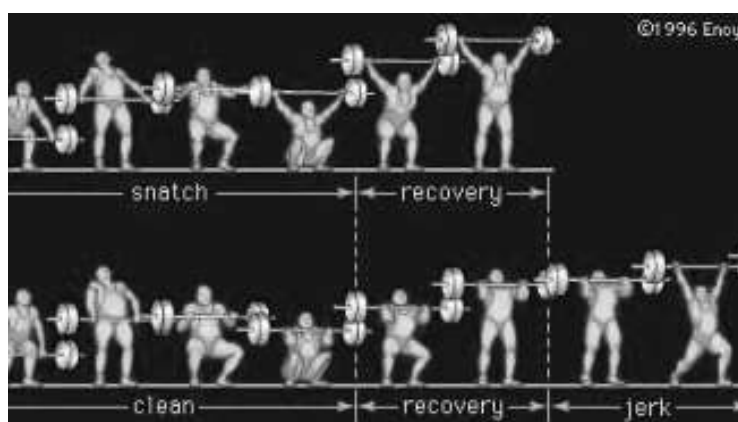
Krok łyżwowy (technika dowolna) polega na popychaniu narty po przekątnej, w celu napędzania się do przodu. Należy włożyć przy tym kroku dużo wysiłku, aby się rozpędzić [141]. Rysunek 14 przedstawia sportowca stosującego technikę dowolną.



Rysunek 14 Krok łyżwowy [141]

Ultramaraton (nazywany ultra odległość lub ultra bieg) jest definiowany jako dowolny bieg, dłuższy niż klasyczny maraton 42,195 km i/lub trwający dłużej niż 6 godzin [142]. Najczęściej ultramaratony rozgrywane są na dystansach: 50km, 100km, 50mil, 100mil. Najdłuższe ultramaratony odbywają się na dystansach: 1000km i 3100mil [143-145]. Większość ultramaratończyków przebiegła przynajmniej jeden maraton przed pierwszym startem w ultramaratonie i nadal uczestniczy w wyścigach maratonowych w trakcie swojej kariery [146].

Jednym ze sportów siłowych jest podnoszenie ciężarów. Dyscyplina ta polega na podnoszeniu przez zawodnika sztangi o określonej masie. Wykonywane jest dwiema technikami: rwanem i podrzutem - widoczne na Rysunku 15. Podczas rwania unosi się sztangę z pomostu bezpośrednio nad głowę i przytrzymuje ją przez kilka sekund. Podrzut wykonuje się dwuetapowo, najpierw zarzucamy sztangę na klatkę piersiową, po czym następuje wybiecie w górę czyli uniesienie sztangi ponad głowę i przytrzymanie kilka sekund [147] [148].



Rysunek 15 Dwie techniki podnoszenia ciężarów: rwanie – górna część , podrzut- dolna część [149]

Przykładem połączenia trzech elementów: treningu siłowego, wytrzymałościowego oraz elementów gimnastyki jest program treningowy Cross-Fit. Celem właściwie ułożonego programu treningowego jest rozwój siły, szybkości, wytrzymałości, koordynacji ruchowej i mocy [150-154]. Taki trening ma za zadanie wypracowanie atletycznej sylwetki, poprawę samopoczucia i ugruntowanie wiary we własne możliwości [150-154]. Jak najlepsze efekty i postęp umożliwia poprawna technika wykonywania ćwiczeń, dostosowany ciężar i stopień trudności do trenującej osoby. Dla treningu Cross-Fit charakterystyczne są ciągłe, zmienne ruchy funkcjonalne o wysokiej intensywności [150-154]. Wiele osób nie mających wcześniej styczności z tego rodzaju treningiem definiuje go jako zestaw wielu ćwiczeń dowolnie połączonych, wykonywanych szybko i intensywnie.

1.3.3. Metody wspomagania treningu sportowego

W połączeniu z treningiem sportowym warto wdrożyć dodatkowe metody, mogące pomóc w poprawie wyników sportowych oraz w regeneracji organizmu sportowca po wysiłku czy ewentualnych urazach. Uzupełnieniem treningu są suplementy diety oraz zabiegi odnowy biologicznej.

Suplementacja

Dużą popularnością cieszą się wśród sportowców dedykowane dla nich suplementy diety. Brak regulacji prawnych dotyczących produkcji suplementów wiąże się z ryzykiem braku

skuteczności i złą jakością. Dlatego dobór suplementów powinien być ostrożny, a wybierane substancje powinny mieć udowodnione badaniami naukowymi korzystne działanie. Australijski Instytut Sportu opracował w 2013 roku [155-158] program suplementacji dla osób uprawiających sport wyczynowo wydzielając 4 grupy suplementów:

- grupa A zawiera odżywki i substancje szczególnie polecane sportowcom. W czasie wysiłku takie substancje wykazują działanie wspomagające. Należą do niej napoje oraz żele i batony dla sportowców, posiłki w formie płynnej, preparaty mineralno-witaminowe, witaminy antyoksydacyjne: E i C, wapń, żelazo, kofeina, kreatyna, dwuwęglan lub cytrynian oraz witamina D,
- grupa B zawiera suplementy polecane sportowcom. Wymagają dalszych badań, ponieważ nie ma wystarczających dowodów na ich skuteczność potwierdzonych naukowo. Ta grupa zawiera: glutaminę, glukozaminę, HMB (β -hydroksymaślan), β -alaninę, siarę, probiotyki, rybozę, melatoninę,
- grupa C zawiera suplementy, których działanie może nie przynosić sportowcom korzyści. Wśród nich wyróżnić można: aminokwasy rozgałęzione, karnityna, pikolinian chromu, inozyna, koenzym Q10, tlenek azotu, cytochrom C, -orizanol i kwas ferulowy, pirogronian, tlenek azotu, ZMA (Zn, Mg i B6 chelatowane aminokwasami), Cordyceps (Maczużnik chiński), Rhodiola Rosea (Różeniec górski), żeńszeń, natlenowana woda,
- grupa D zawiera suplementy niewskazane, nawet zabronione. W tej grupie wyróżniamy: androstendion, 19-norandrostendion DHEA, 19-norandrostendiol, ephedra, strychninę, Tribulus terrestris (Buzyganek ziemny) i inne ziołowe suplementy mające wpływ na wzrost wolnego testosteronu we krwi oraz glicerol.

Jednym z szeroko stosowanych suplementów diety jest ekstrakt z zielonej herbaty, który ma wiele zalet dla każdego, w tym dla sportowców [159-169]. Herbata jest jednym z najpopularniejszych napojów na świecie, a jej właściwości zdrowotne znane są od tysięcy lat. Otrzymywana z rośliny *Camellia Sinensis* jest spotykana w postaci zielonej, czarnej lub Oolong [170-172]. Aby otrzymać zieloną herbatę świeżo zebrane liście natychmiast są gotowane na parze w celu uniknięcia ich fermentacji. Proces gotowania na parze niszczy enzymy odpowiedzialne za rozkładanie barwników w liściach i pozwala zachować liściom swój zielony kolor podczas procesu walcowania i suszenia [159,161,163,165]. Dzięki tym procesom zachowane są naturalne polifenole o właściwościach prozdrowotnych. Kapsułki zawierają wysokoskoncentrowany ekstrakt z liści zielonej herbaty. Ekstrakt z zielonej herbaty (GTE) dzięki dużej zawartości polifenoli i flawonoidów (to organiczne związki chemiczne występujące w roślinach) w tym katechin i epikatechin ma dobroczynny wpływ na organizm człowieka [159-169]. Związki te należą do grupy antyoksydantów. Powodują hamowanie starzenia się komórek, rozwoju nowotworów i zapobiegają chorobom układu krążenia, zwiększają także metabolizm tłuszczów w spoczynku i podczas ćwiczeń. Zielona herbata jest także źródłem witaminy B, C, E, K, karotenoidów, chromu, selenu i magnezu.

Zabiegi odnowy biologicznej

Zabiegi odnowy biologicznej dla sportowców wyczynowych to ważny element przygotowań do startów w zawodach. Krioterapia, sauna, hydroterapia czy masaże łagodzą skutki zmęczenia i regenerują ciało po treningu.

Kriostymulacja ogólnoustrojowa to zabieg stymulujący bodźcowo organizm zimnem. Stosowane są temperatury poniżej -100°C w czasie 2-3 minuty. Zabiegi wykonywane są w komorze kriogenicznej zamkniętej lub z zaleganiem chłodu [173-176]. W kriokomorze

zamkniętej używany jest jako czynnik chłodzący ciekły azot. Taka komora zbudowana jest z przedsionka i komory właściwej. W przedsionku panuje temperatura -60°C , a w komorze właściwej temperatura z zakresu -80 do -160°C . Obie części znajdują się na jednym poziomie. Każde otwarcie drzwi do komory właściwej wywołuje cyrkulację powietrza i straty energii [174]. W kriokomorze z zaleganiem zimna czynnikiem chłodzącym jest syntetyczne ciekłe powietrze (zawartość tlenu $22\pm 2\%$). Do komory właściwej położonej 1,7m pod ziemią prowadzą schody, które pełnią rolę przedsionka. W przedsionku panuje temperatura -70°C , w komorze właściwej temperatury z zakresu -120 do -160°C . Ponieważ powietrze jest cięższe, utrzymuje się w komorze mimo otwierania drzwi. Dzięki temu panuje w takiej komorze większa stabilność temperaturowa [174]. Części ciała najbardziej narażone na działanie niskich temperatur muszą być zabezpieczone, czyli: na ręce zakładane są wełniane rękawice, na stopy i podudzia wełniane skarpety, dodatkowo na stopy drewniane saboty a na uszy wełniana opaska lub czapka. Trzeba również mieć maskę chirurgiczną wyściełaną gazą na nos i usta w celu zabezpieczenia układu oddechowego. Mężczyźni są ubrani w krótkie spodenki, natomiast kobiety mają jednoczęściowy strój kąpielowy [173,175-176]. Przed wejściem do komory uczestnicy osuszają ciało ręcznikiem, aby pozbyć się kropelek potu. Gdyby pot pozostał na skórze, powstałyby kryształki lodu, które spowodują odmrożenia w tych miejscach. Osoby korzystające z zabiegu są informowane o właściwym sposobie oddychania w kriokomorze. Wdech ma być dwukrotnie krótszy niż wydech, i ma odbywać się przez nos. Porcja bardzo chłodnego powietrza po dostaniu się do płuc jest ocieplona do temperatury ciała i podwaja swoją objętość. W przypadku dostania się zbyt dużej ilości powietrza może to spowodować zaburzenia oddechowe [173,175-176]. Do przedsionka uczestnicy są wprowadzani przez terapeutę, który jest ubrany w specjalną odzież ochronną zabezpieczającą przed zimnem. W przedsionku uczestnicy przebywają 30 sekund w celu adaptacji do temperatur kriogenicznych. Następnie są wpuszczani do komory właściwej, w której przebywają 1-3 minut. Rysunek 16 przedstawia przykładową kriokomorę z przedsionkiem i komorą właściwą. Celem kriostymulacji jest wywołanie i zaobserwowanie fizjologicznych, ustrojowych reakcji na zimno. Korzystnymi reakcjami fizjologicznymi na temperatury kriogeniczne są [173,175-176]:

- efekt przeciwbólowy,
- efekt nerwowo-mięśniowy,
- działanie przeciwobrzękowe,
- działanie przeciwzapalne,
- wpływ na układ krążenia,
- wpływ na układ hormonalny,
- wpływ na układ immunologiczny,
- wpływ na psychikę,
- poprawa wydolności fizycznej organizmu.

Po wyjściu z komory należy zmienić strój i obuwie na dres i obuwie sportowe. Uczestnicy podejmują wtedy kinezyterapię – przez 30-60 minut wykonują ćwiczenia według indywidualnego programu i ćwiczenia zbiorowe [173,175-176].



Rysunek 16 Kriokomora z przedsionkiem i komorą główną [177]

Kriostymulacja w sporcie wyczynowym: wspomaga trening wytrzymałościowy i siłowy, przyspiesza regenerację powysiłkową, zapobiega przeciążeniom narządu ruchu, wspomaga leczenie po urazach tkanek miękkich i stawów, wspomaga leczenie zespołów przeciążeniowych mięśni, przyczepów mięśni, stawów i kręgosłupa [173,175-176].

Sauna fińska to zabieg stymulujący naprzemiennie szybkim przegrzaniem i przechłodzeniem organizmu. Jego opis, zasady stosowania i działania można znaleźć w wielu opracowaniach [175-176,178]. Zabieg sauny to szczególny rodzaj kąpieli, w której oprócz podstawowej zmiany temperatury występują także zmiany wilgotności powietrza, natężenia pola elektrycznego i obniżone ciśnienie parcjalne tlenu. Stosowanie zabiegu sauny fińskiej wiąże się z wielowiekową tradycją. Obecnie obowiązujące zasady stosowania tego zabiegu zostały wypracowane przez Skandynawów, głównie Finów. Komora sauny zbudowana jest z drewna bezżywiczego, w jej centrum znajduje się tzw. „ognisko sauny”, które tworzą ogrzane do około 200°C kamienie, przez elektryczne grzałki. Na jednej ze ścian ustawione są kaskadowo drewniane ławy umożliwiające przebywanie na różnych wysokościach podczas wejścia do komory. Przy podłodze temperatura w komorze wynosi 40 °C, a wilgotność względna 20-40%. Przechodząc na coraz wyższe ławy temperatura wzrasta a względna wilgotność maleje. Pod sufitem temperatura osiąga 100 °C a względna wilgotność 2-5% [175]. Natężenie pola elektrycznego w nagrzanej komorze wynosi 100 – 120 V/m [175]. Rysunek 17 przedstawia przykładową komorę do sauny fińskiej. Zabieg sauny fińskiej składa się z trzech faz [176]. Faza pierwsza jest fazą nagrzewania. W komorze sauny z podłożonym suchym ręcznikiem układa się na ławie w pozycji leżącej lub siedzącej, najlepiej w siadzie skulonym [175-176]. Zaczynając od najniższego podestu należy przenosić się na coraz wyższe podesty, osiągając ostatni po około 6-8 minut. Na najwyższym, ostatnim podeście można przebywać maksymalnie 2-3 minuty [176]. Faza druga czyli uderzenie pary wodnej. Polega na polaniu kamieni ogniska 0,5 – 1,0 l wody. Powoduje to gwałtowny wzrost temperatury i wilgotności powietrza. W efekcie występuje wstrząs cieplny z gwałtowną reakcją układów krążenia i oddychania [176]. Ta reakcja jest dodatkowo wzmocniona w wyniku krótkotrwałego zwiększenia natężenia pola elektrycznego (do 2000 – 3000 V/m) w komorze [175]. Podczas uderzenia pary wodnej należy być w pozycji siedzącej i po 2-3 minutach opuścić komorę [176]. Należy pamiętać, aby zmiana pozycji na stojącą nie była gwałtowna. Faza trzecia jest fazą ochładzania [176]. Ta faza powinna odbywać się w dobrze dotlenionym miejscu, najlepiej na świeżym powietrzu. Tradycyjnie wstępne ochłodzenie organizmu odbywa się poprzez polewanie wodą z węża, zaczynając od kończyn i stopniowo polewając aż do klatki piersiowej [176]. Dopiero po wstępnym ochłodzeniu można dalej chłodzić organizm. Dalsze ochładzanie organizmu może się odbywać na wiele sposobów, takich jak: wyjście na świeże powietrze,

zanurzenie w basenie (temperatura wody nie powinna być niższa niż 18 °C), polewanie, poddanie się natryskowi czy rozcieranie śniegiem. Aby ochładzanie było efektywniejsze i objęło także drogi oddechowe stosuje się specjalny sposób oddychania, w którym wydłuża się fazę wydechu. Dzięki temu w czasie wdechu wnika do płuc większa objętość powietrza. Ochładzanie organizmu nie może być zbyt gwałtowne, ponieważ może to wywołać negatywne skutki. Czas ochładzania nie powinien być dłuższy niż 12 minut. Po ochłodzeniu stopy należy ogrzać ciepłą wodą. Trzeba również umyć skórę chłodną wodą bez używania mydła, następnie dokładnie się osuszyć. Podczas jednego seansu sauny zwykle do gorącej komory wchodzi się dwa lub trzy razy. Warunkiem prawidłowego przeprowadzenia sauny jest dobre przegrzanie jak i porządne ochłodzenie organizmu. Z sauny fińskiej można korzystać między innymi: w ośrodkach SPA, uzdrowiskach, w kompleksach basenowych, hotelach czy ośrodkach przygotowawczych dla sportowców.



Rysunek 17 Przykładowa Komora sauny fińskiej [179]

Regularne stosowanie sauny fińskiej polepsza efekty treningu siłowego i wytrzymałościowego [180]. Jest to związane z pozytywnymi procesami które zachodzą w organizmie podczas zabiegu i powodują korzyści:

- organizm stymuluje zwiększenie wydzielania hormonu wzrostu i testosteronu (procesy anaboliczne) [180,181],
- redukuje dolegliwości bólowe występujące po treningu, powodując rozluźnienie naciągniętych mięśni i usprawnienie ruchomości stawów [180,182],
- aktywacja układu nerwowego, aby nastąpił wzrost siły i szybkości skurczu mięśni [183],
- szybsze usuwanie z mięśni produktów przemiany materii powstających podczas intensywnego treningu (kwasu mlekowego) [182].

2. Metodyka badań

2.1. Materiał pomiarowy

Do pomiarów wykorzystano surowice krwi ludzkiej pozyskane w ramach współpracy z Akademią Wychowania Fizycznego im. Jerzego Kukuczki w Katowicach (AWF). Główna partia surowic pochodziła z projektu „*Ocena efektywności oddziaływań cieplnych (ciepła, zimna) stosowanych w odnowie biologicznej u zawodników dyscyplin wytrzymałościowych w rocznym cyklu treningowym*” (Nr rej. 0050/RS4/2016/54) kierowanego przez Prof. Ilonę Pokorę. Zaangażowanymi do badań sportowcami byli elitarni zawodnicy Kadry Polski w biegach narciarskich. W czasie dwóch lat trwania grantu sportowcy zostali poddani 2 seriom zabiegów kriostymulacji oraz 2 seriom zabiegów sauny. W pierwszym roku najpierw przeprowadzono serię zabiegów kriostymulacji ogólnoustrojowej a potem serię zabiegów sauny. Natomiast w drugim roku najpierw serii zabiegów sauny a następnie serii zabiegów kriostymulacji. Zabiegi, po których otrzymano próbki surowicy krwi, przeprowadzane były zawsze w fazie przejściowej okresu przygotowawczego zawodników do startów - pierwsza seria po zabiegu kriostymulacji a druga po serii zabiegów sauny. W eksperymencie z wykorzystaniem serii 10 zabiegów kriostymulacji ogólnoustrojowej wzięło udział 8 sportowców, 2 kobiety i 6 mężczyzn. Natomiast w eksperymencie z wykorzystaniem serii 10 zabiegów sauny fińskiej wzięło udział 9 sportowców, 3 kobiety i 6 mężczyzn.

Zabiegi kriostymulacji ogólnoustrojowej były wykonywane w kriokomorze Górnośląskiego Centrum Medycyny i Rehabilitacji w Katowicach. Zabiegi wykonywano codziennie o tej samej godzinie, pięć dni w tygodniu, od poniedziałku do piątku przez dwa tygodnie. Sportowcy wchodzili do komory w grupach pięcioosobowych. Pojedynczy zabieg kriostymulacji trwał 3 minuty w temperaturze -130°C . Wejście do komory głównej było poprzedzone 30-sekundowym okresem adaptacyjnym w przedsionku w temperaturze -60°C . Kolejno sportowcy szli do komory właściwej, gdzie poruszali się powoli po okręgu, jeden po drugim, bez wzajemnego kontaktu, bez dodatkowych ruchów i rozmów. Po minucie zalecano zmianę kierunku ruchu. Kontakt z uczestnikami był utrzymywany poprzez umieszczoną kamerę w komorze i kontakt głosowy. Próbkę krwi żyłnej pobierano do analiz na początku eksperymentu, następnego dnia po jednej sesji w kriokomorze i pierwszego dnia po dziesięciu sesjach krioterapii, które odbywały się w dni powszednie przez dwa tygodnie. Próbkę krwi zawsze pobierano o tej samej porze rano. Dodatkowo, dwa razy (przed rozpoczęciem zabiegów i po zakończeniu serii zabiegów) pobrano krew bezpośrednio po wysiłku, 1h po wysiłku i po 24 godzinach regeneracji.

Zabiegi sauny fińskiej były wykonywane w komorze AWF w Katowicach. Zabiegi przeprowadzano popołudniu po części codziennych treningów w fazie przejściowej. Średnia temperatura i wilgotność w saunie wynosiły odpowiednio $90 \pm 2^{\circ}\text{C}$ i $15 \pm 3\%$. Jedna sesja w saunie składała się z trzech etapów przegrzania ciała, każdy trwający od 10 do 15 minut, po których następowały przerwy na ochłodzenie ciała. Próbkę krwi żyłnej pobierano do analiz na początku eksperymentu, następnego dnia po jednej sesji w saunie i pierwszego dnia po dziesięciu sesjach w saunie, które odbywały się w dni powszednie przez dwa tygodnie. Próbkę krwi zawsze pobierano o tej samej porze rano. Dodatkowo, -przed rozpoczęciem zabiegów i po zakończeniu serii zabiegów, pobrano krew bezpośrednio po wysiłku, 1h po wysiłku i po 24 godzinach regeneracji.

Podczas badań związanych z suplementacją, kierowanych przez prof. Ewę Sadowską-Krępe, wzięło udział dwudziestu niepalących studentów. Podawane suplementy były w formie miękkich żelatynowych kapsułek (Olimp Labs, Dębica, Polska), w dawce dwóch kapsułek raz dziennie przez 6 tygodni. Wolontariusze zostali podzieleni na dwie grupy: jedna przyjmująca placebo i druga ekstrakt z zielonej herbaty (GTE). Kapsułka placebo zawierała mikrokrystaliczną celulozę, stearynian magnezu i maltodekstrynę. Właściwa kapsułka zawierała 250mg standaryzowanego ekstraktu z zielonej herbaty (245 polifenoli, w tym 200 mg katechin wśród 137 mg 3-galusanu epigallokatechiny) oraz dodatkowe substancje, takie jak maltodekstryna, celuloza mikrokrystaliczna i stearynian magnezu. Próbkę krwi pobierano z żyły łokciowej przed rozpoczęciem suplementacji i po 6 tygodniach stosowania. Pobrania odbywały się w trzech etapach: w spoczynku, 3 minuty po wysiłku i po 1 godzinie biernej regeneracji.

W badaniach związanych z ultramaratonem wzięło udział dziesięciu amatorskich biegaczy płci męskiej. Wszyscy biegacze to osoby niepalące, które przed i podczas biegu nie stosowały niesteroidowych leków przeciwbólowych. Zostali oni zrekrutowani wśród uczestników 12-godzinnego biegu organizowanego przez: Miejskie Centrum Sportu i Rekreacji oraz Klub Rekreacyjno-Sportowy TKKF Jastrzęb w Rudzie Śląskiej. Bieg był rozgrywany w godzinach: 7:00 – 19:00, 28 kwietnia 2018r. w Rudzie Śląskiej. Zwodnicy pokonywali pętlę o długości 1,6 km tyle razy ile byli w stanie. Średnio zawodnicy pokonywali $94,73 \pm 12,97$ km ze średnią prędkością $7,9 \pm 1,1$ km/h. Uczestnicy podczas biegu spożywali co 90-120 min. pokarmy bogate w węglowodany (kanapki, ciastka, owoce i batony energetyczne) oraz co 20-25 min. przyjmowali płyny (woda, napoje izotoniczne). Próbkę krwi pobrano 1 godzinę przed biegiem i natychmiast po zakończeniu dwunastogodzinnego biegu.

Ilość białka całkowitego w próbkach surowicy oznaczano metodą biuretową z użyciem analizatora Hitachi 917 Modular P.

Przygotowanie próbek

Bezpośrednio przed pomiarami DSC przygotowywano wodne roztwory surowicy krwi. Przechowywane wcześniej w temperaturze -20°C próbki surowicy (Rysunek 18) były rozmrażane w temperaturze pokojowej przez 10 - 15 minut. Następnie dokonywano ich 20-krotnego rozcieńczenia w odgazowanej, redestylowanej wodzie. W tym celu pobierano za pomocą automatycznej mikropipety 0,125 ml surowicy i 2,375 ml wody aby uzyskać całkowitą ilość roztworu 2,5ml, pH tak przygotowanych roztworów wynosiło około $7,0 \pm 0,5$.

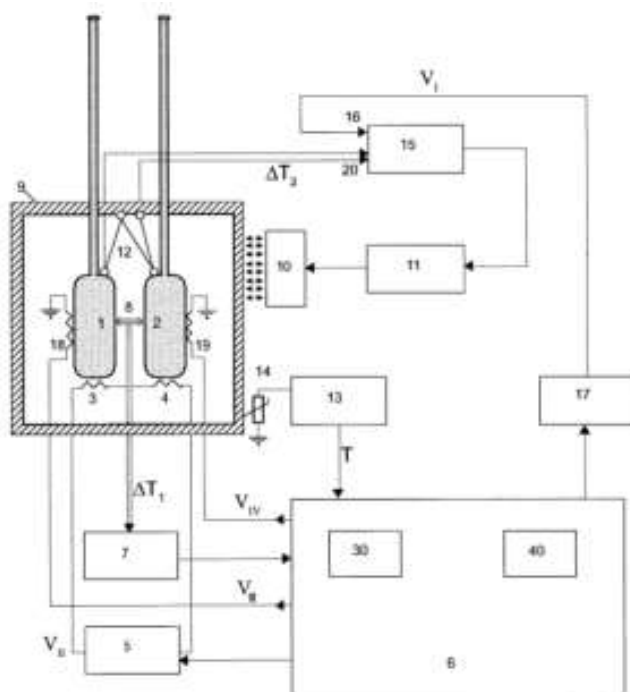


Rysunek 18 Zamrożona próbka surowicy

2.2. Aparatura pomiarowa

Do pomiarów wykorzystano różnicowy mikrokalorymetr skaningowy VP-DSC (MicroCal Co.) wraz z przyrządem ThermoVac (służącym do odgazowywania próbek oraz do mycia komór kalorymetru), a także spektrofotometr UV/VIS Jasco V-530. Do opracowania i analizy pomiarów DSC służyło oprogramowanie MicroCalOrigin. Widma UV/VIS analizowano w ramach oprogramowania Spectra Analysis. Stanowisko do pomiarów DSC przedstawia Rysunek 20, a spektrofotometr UV-VIS zaprezentowano na Rysunku 21.

Schemat ideowy aparatu DSC widoczny jest na rysunku 19. Mikrokalorymetr VP-DSC posiada dwie komory o identycznej geometrii, wykonane z tantalu: komorę próbki i komorę dla substancji referencyjnej, mają one objętość 0,513 ml. Kapilary o średnicy 1,5mm prowadzą do komór, i ułatwiają precyzyjne nałożenie próbki przez specjalne strzykawki Hamiltona i lejek [184]. Komory znajdują się w dwóch koncentrycznych osłonach adiabaticznych i umieszczone w układzie termostatuującym. Każde naczynie pomiarowe posiada dwa układy grzewcze. Jeden jest używany do ogrzewania oraz kompensacji różnicy mocy cieplnej wytwarzającej się podczas pomiaru między naczyniami. Drugi układ grzewczy pierwszego naczynia służy do kalibracji przyrządu a drugiego naczynia do kompensacji stałego składnika różnicy wynikającej z szybkości ogrzewania obu naczyń pomiarowych. Termopary zamieniają różnice temperatur na sygnał elektryczny [184]. Napięcie proporcjonalne do mocy kompensacyjnej, uzyskane w układzie grzewczo-kompensacyjnym stanowi ostateczny sygnał zapisywany jako składowa Y przez komputer. Sygnał zapisywano jako składowa X stanowi napięcie powstałe w wyniku konwersji temperatury mierzonej przez termometr oporowy usytuowany na wewnętrznej osłonie adiabaticznej. Całe urządzenie chłodząco-grzewcze sterowane jest przez regulator. Urządzenie w całości jest sprzężone z komputerem [184].



Rysunek 19 Schemat ideowy aparatu DSC. (1) komora próbki, (2) komora referencyjna, (3,4) elementy grzewcze, (5) zasilacz, (6) komputer, (7) miernik efektu termicznego, (8) czujnik kryształowy, (9) osłona termiczna, (10) urządzenie grzewczo/chłodzące, (11) kontroler, (12) czujniki, (13) urządzenie do pomiaru temperatury bezwzględnej, (14) czujnik, (15) sumujący układ wzmacniacza, (16) zacisk, (17) zasilacz, (18, 19) pomocnicze elementy grzewcze, (20) zacisk, (30) interfejs programu komputerowego, (40) pamięć komputera. [184]

Można pracować w zakresie temperaturowym od 10 do 130 °C i szybkością skanowania do 1,5 °C/min. Jest możliwość dobrania odpowiedniego programu temperaturowego. Do badań został wybrany zakres 20 – 100 °C, szybkość grzania wynosiła 1°C/min. Termostatowanie próbki przed rozpoczęciem właściwego pomiaru trwało 15 minut w temperaturze 20°C.

Urządzenie posiada system, który pozwala na regulację i utrzymanie stałego ciśnienia podczas pomiarów w zakresie do 45 p.s.i (3,062 atm) [185]. Badania przeprowadzono przy stałym ciśnieniu ok. 25 p.s.i (1,7 atm).

Mikrokalorymetr VP-DSC jest bardzo czułym instrumentem zdolnym do wykrywania zmian pojemności cieplnej rzędu μJ . Dzięki dużej czułości (minimalnej, mierzalnej wielkości efektu energetycznego, określającej poziom detekcji aparatu) urządzenia możliwe jest dokonywanie pomiarów roztworów o niskim stężeniu badanej substancji np. białek. Surowym wynikiem konwencjonalnego pomiaru przy użyciu mikrokalorymetru jest zależność mocy od czasu.



Rysunek 20 Stanowisko pomiarowe

Przed właściwym pomiarem, podczas którego komora próbki jest wypełniona badanym roztworem a komora referencyjna rozpuszczalnikiem należy wykonać pomiar linii instrumentalnej. Linie instrumentalną otrzymuje się przy zadanej szybkości skanowania, gdy obie komory są wypełnione rozpuszczalnikiem, czyli wodą lub buforem. W wyniku kilkukrotnych pomiarów powinniśmy otrzymać powtarzalną linię, bez widocznych pików. Jeżeli w wyniku skanowania woda-woda lub bufor-bufor zaobserwować możemy jakiegokolwiek piki lub zmianę nachylenia linii, można to przypisać uszkodzeniu lub zanieczyszczeniu komory. Wykonanie pomiaru linii instrumentalnej przed właściwymi pomiarami jest dobrym testem stanu roboczego kalorymetru [66-67].

Do pomiarów spektroskopowych został wykorzystany spektrofotometr UV-VIS Jasco V-530 zaprezentowany na rysunku 21. Jest to spektrofotometr dwuwiązkowy wyposażony w pojedynczy monochromator i dwa źródła fali świetlnej: lampę deuterową (190-350 nm) i lampę halogenową (330-1100 nm). Wykorzystywanym detektorem w tym układzie jest fotodioda S1337. Można mierzyć w zakresie: 190 – 1100nm, z dokładnością pomiarową $\pm 0,5$ nm. Widma były rejestrowane w zakresie długości fal 200-800 nm [186]. Próbki były badane z szybkością skanowania 400nm/min w jednym cyklu pomiarowym. Do pomiarów zastosowano mikrokuwety kwarcowe. Widma absorpcyjne zostały wykorzystane w celu sprawdzenia i ewentualnej korekcji stężenia białka w roztworze.



Rysunek 21 Spektrofotometr UV-VIS Jasco V-530

2.3. Opracowanie wyników pomiarowych

Analizę wyników pomiarów DSC wykonano za pomocą oprogramowania MicroCal Origin. Na początku od krzywych DSC odejmowano linię woda-woda, służącą jako instrumentalna linia bazowa. Następnie, znając ilość białka całkowitego w badanych próbkach roztworów surowicy, wykonano normalizację krzywych na gram białka. Kolejno dobierano linię bazową typu linearnego i ją odejmowano. Tak przygotowane krzywe były całkowane i wyznaczano podstawowe parametry termodynamiczne złożonego przejścia endotermicznego: charakterystyczne temperatury przejścia (T_m) oraz temperatury maksimumów lokalnych i odpowiadające im pojemności cieplne (C_p), entalpię procesu denaturacji surowicy (ΔH) reprezentowaną przez pole pod pikiem w zakresie temperaturowym przejścia endotermicznego, szerokość połówkową przejścia (HHW) (w połowie wysokości pików, który je reprezentuje), pierwszy moment przejścia względem osi temperatury ($T_{FM} = \frac{\int_{T_1}^{T_2} T C_p dT}{\int_{T_1}^{T_2} C_p dT}$).

Gdy w obszarze przejścia endotermicznego na krzywych DSC roztworu surowicy dla danej osoby w kolejnych etapach eksperymentu zanikło maksimum lokalne (dotyczy to głównie tzw. pierwszego maksimum lokalnego, gdzie ekstremum zamieniało się w zbocze), to wartość C_p była odczytywana w temperaturze dla której występowało ono na krzywej wyjściowej.

3. Cel pracy

Głównym celem pracy była próba zastosowania różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC) do oceny efektów stosowania przez sportowców różnych form wspomagania treningu sportowego poprzez śledzenie przebiegu procesu termicznej denaturacji białek zawartych w surowicy krwi. Teza o możliwości zaobserwowania tych efektów metodą DSC powstała na bazie przeprowadzonych wcześniej w ZFM w Instytucie Fizyki UŚ oraz publikowanych przez inne ośrodki na świecie wyników badań DSC surowicy/osocza krwi. Oparta jest ona na założeniu, że podobnie jak zmiany proteomu płynów fizjologicznych związanych z chorobami, także te wynikające z dużego wysiłku fizycznego mogą się ujawniać w profilach DSC tych płynów. W szczególności, tak wzmożony i długotrwały wysiłek jak w przypadku ultramaratonu, może prowadzić do odpowiedzi ostrej fazy, analogicznej do takiej, która występuje w wielu stanach chorobowych. Jednocześnie, choć dobrze udokumentowany jest bardzo korzystny wpływ umiarkowanej aktywności fizycznej na stan zdrowia, to wiedza na temat czynników regulujących proces adaptacji metabolizmu energetycznego jest stale aktualizowana.

Uwzględnione w podjętych badaniach i analizach wspomaganie treningu miało formę suplementacji i zabiegów odnowy biologicznej obejmujących:

- suplementację ekstraktem z zielonej herbaty (GTE)
- zabiegi kriostymulacji ogólnoustrojowej (WBC)
- zabiegi sauny fińskiej

Oceny efektów suplementacji dokonano na podstawie porównywania wyników uzyskanych dla próbek surowicy pochodzących z krwi pobranej od ochotników trenujących CrossFit w dwóch sesjach: przed treningiem i po treningu wspomaganym suplementacją GTE. Dane zebrane zostały dla dwóch grup uczestników badania: pierwszą grupę stanowiły osoby otrzymujące placebo, a drugą osoby suplementowane GTE. Porównano otrzymane wyniki dla obu grup na różnych etapach cyklu treningowego - przed i po wysiłku oraz po godzinnym odpoczynku.

Efekty samych zabiegów odnowy biologicznej zostały sprawdzone poprzez porównania wyników: przed zabiegami, po jednym zabiegu odpowiednio kriostymulacji lub sauny, i po serii 10 zabiegów kriostymulacji lub sauny, którym poddano narciarzy biegowych. Aby określić wpływ wysiłku i szybkość regeneracji po nim, porównano otrzymane wyniki na różnych etapach cyklu treningowego - przed i po wysiłku oraz po godzinnym i dobowym odpoczynku. Wpływ zabiegów na zmiany powysiłkowe oraz ich cofanie się w okresie regeneracji prześledzono porównując odpowiednie wyniki DSC uzyskane na wymienionych etapach przed zabiegami z wynikami po 10 zabiegach WBC lub sauny.

Wychodząc z założenia, że medyczne konsekwencje długotrwałych treningów i zawodów powinny znaleźć odzwierciedlenie w profilach DSC surowic, w bieżącym opracowaniu podjęto próbę porównania tych profili z profilami osób, które nie uprawiają intensywnie sportu. Dodatkowo, zebrane wyniki umożliwiły porównanie termicznych profili zmian pojemności cieplnej surowic – krzywych DSC wodnych roztworów surowic dla osób reprezentujących dyscypliny wytrzymałościowe (narciarze biegowi, ultramaratończycy) i siłowo-wytrzymałościowe (CrossFit).

Na materiał badawczy wybrano surowicę krwi ludzkiej, ponieważ białka w niej zawarte są cennym źródłem informacji o stanie zdrowia badanego. Złożone przejście endotermiczne obserwowane na krzywych DSC surowic krwi odzwierciedla zmiany pojemności cieplnej, towarzyszące procesowi termicznego rozfałdowania białek składowych surowicy. Dokonano porównań kształtu oraz parametrów termodynamicznych tego przejścia.

Rezultaty prowadzonych badań, stały się podstawą opracowania sześciu spójnych tematycznie artykułów naukowych, których jestem współautorem:

A1. Michnik A, Sadowska-Krępa E, Domaszewski P, Duch K, Pokora I. Blood serum DSC analysis of well-trained men response to CrossFit training and green tea extract supplementation. *J Therm Anal Calorim*. 2017, 130, 1253–1262.

A2. Duch K, Michnik A, Pokora I, Sadowska-Krępa E, Kielboń A. Whole-body cryostimulation impact on blood serum thermal denaturation profiles of cross-country skiers. *J Therm Anal Calorim*. 2019, 138, 4505–4511.

A3. Michnik A, Pokora I, Duch K, Sadowska-Krępa E. Differential scanning calorimetry reveals that whole-body cryostimulation in cross-country skiers can modify their response to physical effort. *J Therm Anal Calorim*. 2021, 143, 255–264.

A4. Duch K, Michnik A, Pokora I, Sadowska-Krępa E. Modification of blood serum DSC profiles by sauna treatments in cross-country skiers during the exercise cycle. *J Therm Anal Calorim*. 2020, 142, 1927–1932.

A5. Michnik A, Duch K, Pokora I, Sadowska-Krępa E. Differences in cryostimulation and sauna effects on post-exercise changes in blood serum of athletes. *Complementary Therapies in Medicine* 2020, 51, <https://doi.org/10.1016/j.ctim.2020.102453>

A6. Michnik A, Sadowska-Krępa E, Kielboń A, Duch K, Bańkowski S. Blood serum denaturation profile examined by differential scanning calorimetry reflects the effort put into ultramarathon by amateur long-distance runners. *Journal of Thermal Biology* 99 (2021) 103013 <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2021.103013>

Wymienione artykuły zostały opublikowane w czasopismach takich jak: *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, którego współczynnik oddziaływania (IF) wynosi 4.626 (100 punktów wg. Wykazu czasopism naukowych MEiN) oraz *Complementary Therapies in Medicine*, którego współczynnik oddziaływania (IF) wynosi 2.446 (100 punktów wg. Wykazu czasopism naukowych MEiN) oraz w *Journal of Thermal Biology*, który ma współczynnik oddziaływania (IF) 2.902 (70 punktów wg. Wykazu czasopism naukowych MEiN). Wszystkie wymienione czasopisma znajdują się na tzw. liście filadelfijskiej.

Rezultaty prac badawczych, zamieszczone w wymienionych publikacjach, jako materiał stanowiący podstawę rozprawy doktorskiej, szczegółowo omówiono w rozdziale 4 niniejszej pracy. Pełne teksty opublikowanych artykułów zostały zamieszczone w rozdziale 5.

Wyniki pracy badawczej pośrednio związane z zakresem pracy doktorskiej zebrano w dwóch artykułach naukowych:

B1. Kielboń A, Michnik A, Polaczek-Grelík K, Duch K, Sadowska-Krępa E. Differential scanning calorimetry of human blood serum exposed in vitro to X – ray radiation. *Thermochimica Acta*. 2019, 680, <https://doi.org/10.1016/j.tca.2019.178358>

B2. Michnik A, Kielboń A, Duch K, Sadowska-Krępa E, Pokora I. Comparison of human blood serum DSC profiles in aqueous and PBS buffer solutions. *J Therm Anal Calorim*. 2021, <https://doi.org/10.1007/s10973-021-11008-6>

Prace te nie zostały włączone do rozprawy.

Rezultaty badań były również prezentowane na poniżej wymienionych konferencjach naukowych w formie prezentacji lub posterów:

- Konferencja BioMedTech Silesia 2017 – Junior (2017) Zabrze, Polska,
- II Kongres Polskiego Towarzystwa Krioterapii (2017) Wrocław, Polska,
- 13thConference on Calorimetry and Thermal Analysis of the Polish Society of Calorimetry and Thermal Analysis (2018) Zakopane, Polska,
- III Kongres Polskiego Towarzystwa Krioterapii (2019) Wrocław, Polska,
- 5thCentral and Eastern European Committee for Thermal Analysis and Calorimetry & 14thMediterranean Conference on Calorimetry and Thermal Analysis (2019) Rzym, Włochy,
- 45 Zjazd Fizyków Polskich (2019) Kraków, Polska,
- Pomiędzy naukami VIII Edycja konferencji dla młodych naukowców (2019) Chorzów, Polska.

4. Opis badań własnych - synteza

W niniejszym rozdziale omówione zostaną wyniki badań własnych wodnych roztworów surowicy krwi z wykorzystaniem skaningowej kalorymetrii różnicowej (DSC), których celem było określenie wpływu wysiłku i efektów suplementacji oraz wybranych zabiegów odnowy biologicznej na przebieg procesu termicznej denaturacji białek zawartych w surowicy krwi sportowców.

Termiczna denaturacja białek wymaga energii potrzebnej do zniszczenia słabych sił stabilizujących ich przestrzenną strukturę, głównie do zerwania wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych. Tak powstałe zmiany cieplne w biomolekule są monitorowane metodą skaningowej kalorymetrii różnicowej. Złożone przejście endotermiczne obserwowane na krzywych DSC surowic krwi odzwierciedla zmiany pojemności cieplnej, towarzyszące procesowi termicznego rozfałdowania białek składowych surowicy. Dokonano porównań kształtu oraz parametrów termodynamicznych tego przejścia.

Określenie wpływu stosowanych zabiegów odnowy biologicznej czy suplementacji na poprawę wyników sportowych i regeneracji jest stale aktualnym wyzwaniem. Lepsze poznanie różnych aspektów tego zagadnienia pozwoli w przyszłości na bardziej świadomy dobór stosowanej metody wspomagania treningów, co jest szczególnie istotne dla grup zawodowo zajmujących się sportem.

W pracach stanowiących podstawę doktoratu, możemy wyróżnić następujące problemy badawcze:

- możliwość odzwierciedlenia w badaniach DSC surowicy krwi zmian wywołanych w niej treningiem wytrzymałościowym i siłowo-wytrzymałościowym, bezpośrednim wysiłkiem, o wysokiej i ekstremalnie wysokiej intensywności oraz śledzenia procesu regeneracji organizmu po wysiłku,
- czy efekt stosowania ekstarktu z zielonej herbaty jako suplementu diety sportowców trenujących CrossFit można dostrzec porównując profile DSC ich surowicy krwi przed suplementacją i po suplementacji oraz profile osób suplementowanych z przyjmującymi placebo?
- możliwość rejestracji przy pomocy skaningowej kalorymetrii różnicowej skutków stosowania termicznych zabiegów odnowy biologicznej (kriostymulacji ogólnoustrojowej i sauny) przez sportowców,
- porównanie i dyskusja różnic wynikających ze stosowania dwóch różnych zabiegów odnowy biologicznej takich jak: kriostymulacja ogólnoustrojowa i sauna, uwidocznionych na termicznych profilach zmian pojemności cieplnej roztworów surowicy krwi.

Uzyskane rezultaty, opublikowane w cyklu artykułów [A1-A6] wskazują, że zastosowanie DSC pozwala na zaobserwowanie zmian zachodzących w surowicy krwi na skutek wysiłku fizycznego – treningu sportowego, ocenić wpływ suplementacji i zabiegów cieplnych wspomagających trening oraz zauważyć wpływ uprawianej dyscypliny sportowej na zmiany w proteomie surowicy krwi zasugerowane kształtem badanego przejścia endotermicznego.

Specyfika przeprowadzonych badań własnych pozwoliła na wyróżnienie następujących trzech podrozdziałów:

4.1 Prezentacja krzywych DSC wodnych roztworów surowicy krwi osób uprawiających różne dyscypliny sportowe

4.2 Wpływ wysiłku fizycznego na profile DSC surowic

4.3 Wpływ stosowania w trakcie treningu suplementacji lub zabiegów odnowy biologicznej na zmiany zachodzące w surowicy krwi, odzwierciedlone w profilach DSC jej roztworów

4.1. Prezentacja krzywych DSC wodnych roztworów surowicy krwi osób uprawiających różne dyscypliny sportowe

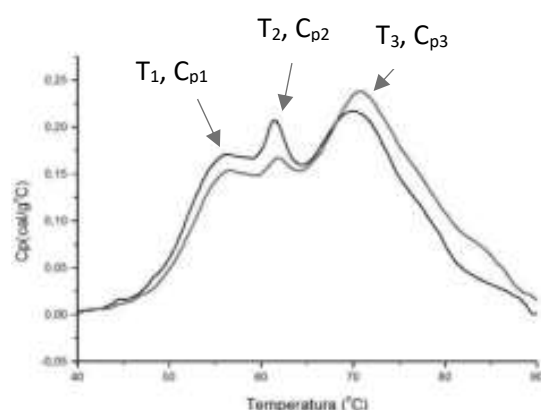
W rozdziale tym zostaną zaprezentowane eksperymentalne krzywe DSC uzyskane z pomiarów roztworów wodnych surowicy krwi sportowców uprawiających różne dyscypliny sportowe. Otrzymywane profile DSC próbek klinicznych surowicy krwi charakteryzują się występowaniem złożonego przejścia endotermicznego w zakresie temperatur 40 °C – 90 °C. Analogicznie, jak opisano to w Rozdziale 1.2, jego kształt wynika z ważonej sumy wkładów pochodzących od termicznej denaturacji białek obecnych w surowicy. Dobre przybliżenie eksperymentalnie uzyskanego przejścia daje uwzględnienie najliczniej występujących w surowicy białek. Jednakże dokładny kształt tego przejścia jest dodatkowo uzależniony od modyfikacji struktury białek, np. w wyniku wiązania różnych ligandów oraz interakcji pomiędzy białkami.

Cykl publikacji [A1-A6] umożliwia prześledzenie profili DSC surowic krwi osób trenujących CrossFit, uprawiających narciarstwo biegowe i biorących udział w ultramaratonie, a w artykule B2 pokazano różnice pomiędzy obserwowanymi przejściami endotermicznymi dla wodnych i buforowych (pH 7.4) roztworów surowic osób nie uprawiających aktywnie żadnej dyscypliny sportowej. Prezentowane w opublikowanych artykułach naukowych [A1-A6] profile DSC surowic krwi sportowców uzyskane zostały przy zachowaniu tych samych warunków eksperymentalnych, takich jak: rodzaj rozpuszczalnika, stopień rozcieńczenia surowicy, procedura rozmrażania próbki, zakres pomiarowy, szybkość skanowania. Pozwoliło to na otrzymanie w dużym stopniu powtarzalnych wzorów krzywych DSC wodnych roztworów surowic krwi sportowców, podobnych także do uzyskanych we wcześniejszych badaniach [187-188]. W zakresie obserwowanego złożonego przejścia endotermicznego najczęściej widoczne są trzy maksima lokalne. Ich liczba jest jednak cechą osobniczą i ogólnie wyróżnić można od dwóch do czterech maksimów lokalnych. Kształt przejścia rejestrowanego dla roztworów wodnych surowic (pH ~ 6.5) różni się od tego dla roztworów buforowych o pH 7.4, co zilustrowano i przedyskutowano w opublikowanym artykule naukowym [B2]. Jest to związane z różnicami pojawiającymi się w profilach DSC głównych białek surowicy w zmiennych warunkach fizykochemicznych, a także oddziaływaniami pomiędzy nimi [73,75-76].

Rysunek 22 przedstawia zestawienie uśrednionych krzywych DSC surowic krwi w roztworze wodnym osób mało aktywnych fizycznie [B2] i narciarzy biegowych [A2-A5]. W zakresie piku endotermicznego wyraźnie widoczne są trzy maksima lokalne. Pierwsze (T_1 , C_{p1}), przy około 58°C reprezentuje głównie wkład od nieligandowanej formy albuminy [73,189]. Drugie (T_2 , C_{p2}), które nie zawsze jest widoczne, pojawia się przy około 62°C i pochodzi od haptoglobiny [190,B2] – białka ostrej fazy. Zazwyczaj najintensywniejszy trzeci pik (T_3 , C_{p3}) przy około 70°C reprezentuje wkład od immunoglobulin, a także β -globulin, na co wskazują znane z doniesień literaturowych profile DSC białek oraz znalezione korelacje [187] pomiędzy intensywnością ekstremów a zawartością odpowiednich frakcji białek u badanych sportowców. Czasami możemy zaobserwować czwarte maksimum lokalne przy około 83°C, które pochodzi prawdopodobnie od domeny CH₃ immunoglobuliny IgG1 lub transferryny [28-29,101,B2].

W przypadku zaprezentowanej krzywej DSC surowicy osób nie uprawiających aktywnie żadnego sportu możemy zauważyć, że pierwsze maksimum lokalne jest najniższe, pik

pochodzący od haptoglobiny jest dość intensywny i podobnej wysokości co trzecie maksimum lokalne. Przejście termiczne obecne na uśrednionej krzywej DSC reprezentującej osoby uprawiające narciarstwo biegowe jest nieco przesunięte w kierunku wyższych temperatur, a dwa pierwsze maksima lokalne są mniej intensywne niż u osób mniej aktywnych fizycznie. Natomiast trzecie maksimum lokalne jest najintensywniejsze. Stosunek wartości C_{p3}/C_{p1} wynosi 1,55, co wskazuje na podwyższony poziom gammaglobulin w stosunku do albumin. Zgadza się to z doniesieniami, że dobrze zaplanowany i poprawnie realizowany trening wspiera układ odpornościowy [180].

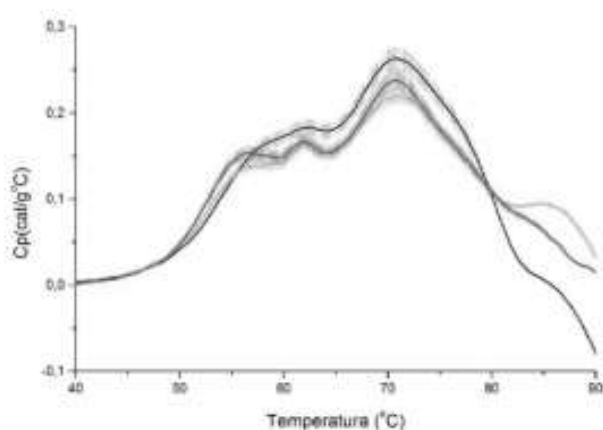


Rysunek 22 Porównanie średniej krzywej osób nieaktywnych fizycznie (czarna krzywa) i narciarzy biegowych (czerwona krzywa) ze wskazaniem parametrów ekstremów lokalnych przejścia endotermicznego

Poza głównym nurtem badań, przeprowadzono wstępną analizę krzywych spoczynkowych surowicy krwi sportowców reprezentujących różne dyscypliny sportowe, a wyniki zostały zaprezentowane na konferencji *Pomiędzy naukami*. Analiza krzywych prezentowanych w cyklu artykułów [A1, A3, A4, A6] surowic krwi sportowców reprezentujących dyscypliny wymagające różnego typu treningu: wytrzymałościowego i siłowo-wytrzymałościowego, wykazała pewne różnice w kształcie obserwowanego złożonego przejścia endotermicznego. Jak pokazuje Rys.23, uprawianie wyczynowo wybranej dyscypliny sportowej ma prawdopodobnie pewien wpływ na kształt spoczynkowego profilu DSC surowicy krwi. Organizm adaptuje się do wysiłku charakterystycznego dla danej dyscypliny, co wiąże się ze zmianami w proteomie surowicy. Najbardziej wyróżnia się profil osób uprawiających Crossfit. Stosunek wartości C_{p3}/C_{p1} wynosi w tym przypadku 1,58. Jest to sport, który łączy w sobie cechy sportów wytrzymałościowych i siłowych. Możemy zauważyć, że profile ultramaratończyków i osób uprawiających CrossFit są do siebie zbliżone, pomimo różnych typów uprawianych sportów. W obydwu przypadkach zauważalna jest redukcja pierwszego maksimum lokalnego. Może ona być spowodowana spadkiem frakcji nieligandowanej formy albuminy. Na krzywej narciarzy biegowych obserwujemy wyraźniej zarysowane pierwsze maksimum lokalne. Na wszystkich trzech krzywych widoczne jest mniej lub bardziej intensywne drugie maksimum lokalne. Dodatkowo możemy zobaczyć u ultramaratończyków czwarte maksimum lokalne przy około 85°C, które pochodzi od domeny CH₃ immunoglobuliny IgG1 (domena CH₃ znajduje się we fragmencie ulegającym krystalizacji i odpowiada za oddziaływanie IgG z receptorem FcγR na komórkach efektorowych [191-193]) lub transferryny (transport żelaza w organizmie).

Zaobserwowane różnice mogą wskazywać na modyfikacje składu białkowego surowicy krwi związane z rodzajem uprawianego sportu, w szczególności różnice w proporcjach białek

obecnych w surowicy. Białka osocza/surowicy podlegają dynamicznym zmianom, odnawiają się i degradują. Głównym źródłem białka dla ludzi jest pożywienie, a dla zawodników dyscyplin wytrzymałościowych zaleca się 1,2-1,4 g/kg/dzień [194]. Narciarstwo biegowe jako sport wytrzymałościowy, angażuje większość mięśni ludzkiego organizmu. Wyczerpujące treningi zwiększają zapotrzebowanie na aminokwasy rozgałęzione będące źródłem energii, takie jak alanina, leucyna i izoleucyna oraz aminokwasy hamujące proces zmęczenia, dostarczane w zbilansowanej diecie lub suplementach [195-196]. Haptoglobina odpowiada za zapobieganie utracie żelaza z moczem czyli wychwytuje i nieodwracalnie wiąże wolną hemoglobinę z krwi. Taki kompleks hemoglobina-haptoglobina jest za duży i nie ulega przesączaniu kłębuszkowemu. Dzięki prawidłowemu czasowi życia erytrocytów stężenie haptoglobiny jest niewielkie, ale wystarczające do pełnienia swojej funkcji [197]. Niedobór żelaza jest powszechny wśród sportowców. Podstawową funkcją żelaza w organizmie jest transport tlenu. Gdy obserwujemy niedobór żelaza transport tlenu do mięśni podczas wysiłku fizycznego zmniejsza się, co powoduje obniżenie maksymalnej wydolności fizycznej i osłabienie wytrzymałości fizycznej [198].



Rysunek 23 Zestawienie uśrednionych krzywych DSC surowic krwi sportowców uprawiających różne dyscypliny sportowe: czarna krzywa CrossFit (n=20), zielona krzywa ultramaraton (n=10), czerwona krzywa narciarze biegowi (n=9); zacienione obszary dla każdej krzywej są błędem standardowym

Proporcje intensywności poszczególnych maksimów lokalnych mogą być jeszcze inne niż te widoczne na Rysunkach 22 i 23. Przykładowo, w uśrednionych spoczynkowych profilach DSC surowic krwi amatorów rowerzystów [187] oraz studentów AWF płci męskiej, uprawiających sporty siłowe [188], pierwsze maksimum lokalne charakteryzowało się znacząco wyższą intensywnością w porównaniu z drugim, a zatem większym wkładem od frakcji swobodnej albuminy niż w przypadku sportowców, których surowice badano w ramach prac związanych z bieżącą rozprawą doktorską.

Krzywe DSC surowicy krwi sportowców sugerują możliwość zaobserwowania na ich podstawie długotrwałych efektów wpływu wysiłku fizycznego charakterystycznego dla danej dyscypliny sportowej. Sugestię tę należałoby jednak potwierdzić przeprowadzając badania w oparciu o bardziej liczne grupy sportowców.

4.2. Wpływ wysiłku fizycznego na profile DSC surowic

Badania metodą skaningowej kalorymetrii różnicowej przeprowadzone dla roztworów surowicy krwi sportowców [A1, A3, A4, A5, A6] umożliwiły przeanalizowanie kształtu uzyskanych eksperymentalnych krzywych DSC pod kątem wpływu wysiłku na zmiany w surowicy krwi. W oparciu o informacje uzyskane w wyniku analizy przejścia endotermicznego obserwowanego na krzywych DSC surowic, możliwe było także wnioskowanie na temat procesów regeneracji organizmu po krótkotrwałym wysiłku fizycznym [A1, A3, A4, A5]. W części przeprowadzonych eksperymentów dodatkowo sprawdzono poziomy biomarkerów krwi między innymi biomarkery uszkodzeń mięśni, które porównywano na różnych etapach eksperymentu.

Intensywny wysiłek fizyczny prowadzi do utraty płynów z potem i zmian stężeń hormonów (takich jak: wzrost stężenia adrenaliny, glukagonu, kortyzolu, ACTH). Wiąże się to ze zmianami stężeń kreatyniny, białka całkowitego, albuminy i substancji wiążących się z albuminą - wapnia, bilirubiny, hormonów, leków. Wzrostowi ulec może liczba erytrocytów i leukocytów [58,60]. Na podstawie danych zamieszczonych w pracach Fortunato i innych 2018 [199] wnioskować można, że pojedyncza sesja protokołu ćwiczeń siłowych może zmienić parametry fizjologiczne i immunologiczne oraz stymulować produkcję i uwalnianie ważnych miokina. Cytowane dane wskazują, że pojedyncza sesja intensywnego treningu siłowego powoduje podwyższenie częstości akcji serca, oraz zmianę parametrów RPE (ocena postrzeganego wysiłku), VAS (wizualna skala analogowa bólu), a także zwiększenie stężenia mleczanu i kinazy keratynowej. Dodatkowo zmianie ulegać może również liczba neutrofilów, limfocytów i monocytów oraz miokina IL-6, BDNF i FABP3. Fizjologiczną funkcją miokina wytwarzanych przez mięśnie szkieletowe jest ochrona i poprawa funkcjonalności wielu narządów. Istnieją przekonujące dowody na to, że czynniki wydzielane przez mięsień szkieletowy działają jako mediatory sygnalizacji wewnątrzwydzielniczej i biorą udział w korzystnym wpływie ćwiczeń na prawie wszystkie typy komórek i narządy. Wykazany bezpośredni związek między intensywnością wykonywanych ćwiczeń fizycznych a zmianami zachodzącymi w układzie odpornościowym organizmu wskazuje, że możliwe są silne i długotrwałe modyfikacje powodujące zmiany odporności organizmu [199]. Reakcje na wysiłek są osobniczo zmienne i zależą od wytrenowania organizmu [200-202].

W eksperymentach prowadzonych w ramach niniejszej pracy, pierwszą badaną w kontekście wpływu wysiłku na surowice krwi grupą były osoby trenujące CrossFit (CF). Osoby ćwiczące CrossFit chcą osiągnąć maksymalną sprawność fizyczną łącząc różnego rodzaju ćwiczenia fizyczne. Szczegółowa analiza uzyskanych wyników DSC pokazała, że odbycie 6-tygodniowego treningu CrossFit znajduje odzwierciedlenie w niektórych parametrach analizowanego przejścia endotermicznego (Fig. 7 – 9 w [A1]). Dobrze zauważalne są wyższe wyjściowe wartości Cp_2 i Cp_3 w sesji po treningu w stosunku do wartości określonych dla próbek pobranych przed treningiem. Zaobserwowana tendencja jest zgodna z charakterem różnic pomiędzy uśrednioną krzywą DSC surowic osób trenujących CrossFit a pozostałymi pokazanymi na Rys. 23 w poprzednim podrozdziale.

Jednakże uzyskane dane eksperymentalne odnoszące się do bezpośredniego wpływu wysiłku, w tym porównanie średnich krzywych DSC surowicy krwi sportowców uprawiających CrossFit przed i po wysiłku (Fig. 2 w pracy [A1]) pokazało, że ćwiczenia fizyczne wykonane przez dobrze wytrenowanych mężczyzn praktycznie nie zmieniają obserwowanego przejścia

endotermicznego. Świadczy to o braku lub tylko słabej (prawie nie zauważalnej w badaniach DSC) bezpośredniej reakcji białek surowicy na forsowne ćwiczenia w przypadku charakteryzujących się wysoką sprawnością fizyczną uczestników badania. Należy jednak zaznaczyć, że wyniki charakteryzowały się dość dużą zmiennością osobniczą.

Gomes i in. [203] wykazali znaczny wzrost ilości białych krwinek, neutrofili, limfocytów i monocytów po treningu CrossFit. Stwierdzili także, że osoby z dłuższym doświadczeniem mają większą liczbę limfocytów w porównaniu z osobami początkującymi, co może być związane z większą zdolnością do regeneracji między sesjami treningowymi dzięki pamięci układu odpornościowego na ten rodzaj stresu. Zgodnie z doniesieniami Petersen i Pedersen (2005) osoby aktywne fizycznie wykazują zmniejszone reakcje zapalne z powodu poprawy stanu immunologicznego jako przewlekłej odpowiedzi na wysiłek fizyczny [204].

Chociaż wpływ wysiłku na analizowane przejście endotermiczne odzwierciedlające denaturację białek surowicy był słabo zauważalny, to zaobserwowano pewne zależności parametrów tego przejścia od etapu eksperymentu (Fig. 6 – 9 w [A1]). Charakter tych zależności dla T_1 , T_2 i T_3 (Fig. 6 w [A1]), dH i HHW (Fig. 8, 9 w [A1]), był bardzo podobny w sesjach przed i po treningu CrossFit. Przedwysiłkowe uśrednione wartości parametru C_{p2} w pierwszej próbie (przed treningiem) okazały się istotnie niższe niż powysiłkowe po treningu. Głównym źródłem lokalnego maksimum (T_2 , C_{p2}) jest haptoglobina, białko ostrej fazy. Haptoglobina wiąże wolną hemoglobinę uwalnianą z erytrocytów i dlatego hamuje jej aktywność oksydacyjną. Znalezione istotne ujemne korelacje między VO_{2max} po treningu CF a powysiłkowym T_2 ($r = -0,52$; $p = 0,03$) oraz powysiłkowym C_{p2} ($r = -0,68$; $p = 0,03$) po treningu. Wyższy poziom VO_{2max} po treningu CF warunkuje mniejszy wzrost T_2 i C_{p2} po treningu. Zależność pomiędzy intensywnością VO_{2max} i C_{p2} potwierdza obserwację, że brakowi lokalnego maksimum T_2 najczęściej towarzyszyło VO_{2max} wyższe niż $50 \text{ ml min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$.

Dane biochemiczne (Tab. 2 w [A1]) LA, CK i LDH, porównywano w celu oceny zmian świadczących o kondycji fizycznej i wydolności fizycznej organizmu. Aktywność spoczynkowa, jak i powysiłkowa LDH mieściły się w zakresie referencyjnym, tj. $230\text{--}460 \text{ U L}^{-1}$. Analiza wykazała, że poziom LA znacząco wzrósł po wysiłku w obu próbach. Zaobserwowano nieco wyższe powysiłkowe wartości CK w porównaniu z innymi fazami eksperymentu. W pracy przeglądowej Jacob i inni 2020 [205] wykazano wpływ treningu CrossFit niezależnie od zastosowanego protokołu na poziom markerów stresu hormonalnego, metabolicznego i zapalnego. Badania Poderoso i inni 2019 [206] dotyczące analizy długotrwałych reakcji hormonalnych i odpornościowych zachodzących w organizmie kobiet i mężczyzn uprawiających CrossFit przez sześć miesięcy wskazują na zmiany poziomu testosteronu i kortyzolu w surowicy krwi mężczyzn. Zaobserwowano adaptację układu odpornościowego u obu płci, która wynika z osobliwych zmian stężenia podstawowych limfocytów bowiem w ciągu pierwszych czterech miesięcy treningu CrossFit następuje spadek stężenia podstawowych limfocytów T CD8, które osiąga wartość wyjściową po sześciu miesiącach trwania treningu.

Dalsze badania związane z bieżącą pracą doktorską, w których grupę badawczą stanowili elitarni narciarze biegowi, lepiej pokazały bezpośredni wpływ wysiłku fizycznego na zmiany w profilach termicznej denaturacji białek zawartych w surowicy krwi. Narciarze biegowi wykonywali ten sam rodzaj testu wysiłkowego co osoby trenujące CrossFit – wysiłek na ergometrze rowerowym. Podczas biegania na nartach angażowane są mięśnie całego ciała oraz potrzebna jest wytrzymałość, szybkość i siła. Stabilizacja i równowaga, są niezbędne do

utrzymywania optymalnej techniki biegu. Dlatego, aby osiągnąć sukces w biegach narciarskich potrzebny jest mądrze ułożony plan treningowy, w którym występuje duża różnorodność środków i metod treningowych.

W przypadku narciarzy biegowych [A3, A4, A5] wpływ wysiłku głównie odzwierciedla się na uśrednionych krzywych DSC w dwóch zakresach przejścia endotermicznego: 1) w zakresie temperatur 50-60°C w formie spadku intensywności 2) w zakresie 65-80°C w formie przesunięcia maksimum przejścia w kierunku wyższych temperatur i wzrostu jego intensywności (Fig. 1, 3 w [A3], Fig. 2, 4a i 5a w [A4], Fig. 1 w [A5]). Dodatkowo, na krzywych po wysiłku i jednej godzinie odpoczynku, obserwujemy znaczący wkład od przejścia egzotermicznego w zakresie temperatur powyżej 85°C (Fig. 1 w [A3], Fig. 2 w [A4], Fig. 1, 2 w [A5]). Może być to związane ze zwiększoną tendencją do agregacji białek surowicy po ich denaturacji w tych grupach próbek.

Biorąc pod uwagę fakt, że dominującym białkiem surowicy krwi jest albumina, nasuwa się przypuszczenie, że dużą część obserwowanych zmian można prawdopodobnie łączyć z tym białkiem. Z oznaczeń laboratoryjnych poszczególnych frakcji białek w surowicy badanej grupy sportowców wynika jednak, że procentowy udział albumin w białku całkowitym nie uległ istotnej zmianie po wysiłku. Fakt ten nie wyklucza możliwości wytłumaczenia zmian w profilu przejścia denaturacyjnego surowicy powysiłkowymi zmianami we frakcji albumin. Makrocząsteczki albuminy mogą bowiem przyjmować różne konformacje i posiadać odmienne właściwości fizykochemiczne zależnie od formy. Podobnie jak inne białka, albumina ulega wielu modyfikacjom, w tym glikacji i utlenieniu. Stres oksydacyjny, często towarzyszący wyczerpującym ćwiczeniom, może powodować zmiany struktury i właściwości albuminy [207-208]. Fizjologicznie albumina ludzka występuje w osoczu/surowicy krwi w dwóch formach: zredukowanej (Human Mercaptalbumin, HMA) jako merkaptalbumina oraz w formie utlenionej (Human Nonmercaptalbumin, HNA) jako niemerktalbumina [209]. Obie formy HMA i HNA mogą wzajemnie w siebie przechodzić. Forma zredukowana występuje w zdecydowanej większości. Jednakże w niektórych stanach chorobowych (m.in. w cukrzycy), ale także podczas uprawiania intensywnych ćwiczeń, zawartość frakcji merkaptalbuminy wyraźnie maleje. Cząsteczka albuminy wykazuje wysoki stopień zmienności konformacyjnej w zależności od pH środowiska. Dodatkowo, transport ligandów zarówno tych egzo-, jak i endogennych w kompleksie z albuminą wpływa na jej strukturę przestrzenną.

Zatem zaobserwowany spadek intensywności przejścia w obszarze występowania pierwszego maksimum lokalnego z jednoczesnym wzrostem intensywności w zakresie temperaturowym trzeciego maksimum lokalnego, może być spowodowany zmniejszeniem frakcji wolnych albumin, a wzrostem albuminy związanej z ligandami. Frakcja albumin związanych z ligandami ulega bowiem denaturacji w tym samym zakresie temperatur co frakcja immunoglobulin [75]. W odpowiedzi na wysiłek fizyczny mięśnie szkieletowe i ich czynności hormonalne są ważnym źródłem uwalniania do krwiobiegu peptydów, mikroRNA, metabolitów i pęcherzyków pozakomórkowych zawierających dowolną liczbę tych cząsteczek [210]. Badania naukowe prowadzone wiele lat wykazały, że tkanka mięśni szkieletowych, która stanowi ponad 40% masy ciała dorosłego człowieka może uwalniać cząsteczki zwane miokinami pod wpływem wzmożonego wysiłku fizycznego [210-211].

Szczegółowe wyniki analizy statystycznej uzyskanych parametrów przejścia endotermicznego surowicy krwi zrelacjonowano i przedyskutowano w pracy [A3]. Przeprowadzono analizę ANOVA z powtarzanymi pomiarami dla średnich parametrów

w poszczególnych etapach sesji treningowej - etap determinował poziomy czynnika powtarzanych pomiarów. Wyniki wykazały istotne statystycznie różnice pomiędzy średnimi wartościami parametrów T_1 , C_{p1} , T_3 i C_{p3} w poszczególnych etapach (etapy sesji treningowej, w której pobrano próbki surowicy to: wyjściowy – przed ćwiczeniami, po wysiłku, po jednej godzinie odpoczynku, po dobie odpoczynku), gdy ćwiczenia były wykonywane w sesji przed rozpoczęciem zabiegów WBC. Test post hoc Tukey’a wykazał istotny wzrost T_1 , T_3 i C_{p3} po wysiłku oraz istotnie niższą średnią wartość C_{p1} bezpośrednio po wysiłku niż po 24 godzinach odpoczynku. Dodatkowo wykazano, wyższą wartość T_3 po wysiłku niż po 1 godz. i po 24 godz. odpoczynku. Warte uwagi rezultaty otrzymano dla stosunku C_{p3}/C_{p1} , ponieważ jego wartość istotnie wzrasta po wysiłku. Następnie, podczas rekonwalescencji, wartość C_{p3}/C_{p1} spada i po 24 godzinach powraca do wartości wyjściowej. Uważa się, że ćwiczenia fizyczne mogą odgrywać główną rolę we wzmacnianiu endogenne systemu obronnego przed mechanicznym i metabolicznym uszkodzeniem mięśni, co może wyjaśniać zwiększony udział immunoglobulin [210].

Ciekawą istotną statystycznie korelację stwierdzono między HR (Heart Rate – ilość uderzeń serca na minutę) przy progu beztlenowym (HR-AT) a stosunkiem C_{p3}/C_{p1} na wszystkich etapach sesji ćwiczeń (przed wysiłkiem $r = -0,85$ a $p = 0,008$; po wysiłku $r = -0,81$ a $p = 0,014$; po 1h odpoczynku $r = -0,76$ a $p = 0,03$; po 24h odpoczynku $r = -0,84$ a $p = 0,01$). Ujemne korelacje wskazują, że wyższym wartościom HR-AT towarzyszą niższe współczynniki C_{p3}/C_{p1} . Nie byliśmy w stanie racjonalnie zinterpretować znalezionej zależności.

Zmiany uwidocznione w średnich profilach DSC surowicy oraz wartości otrzymane dla C_{p1} , C_{p3} sugerują spadek albumin i wzrost zawartości gammaglobulin w surowicy po wysiłku. Zgodnie z oznaczeniami laboratoryjnymi stężenie gammaglobulin rzeczywiście wzrosło z $12,2 \pm 0,5 \text{ g L}^{-1}$ przed treningiem do $13,3 \pm 0,9 \text{ g L}^{-1}$ po treningu. Wzrost ten jest na granicy istotności statystycznej. Jednak poziom albumin nie jest niższy po wykonaniu ćwiczenia. Nawet istotnie rośnie z $42,2 \pm 0,4$ do $44,6 \pm 0,4 \text{ g L}^{-1}$. Biorąc pod uwagę statystycznie istotny wzrost poziomu białka całkowitego w surowicy krwi po wysiłku (z $78,6 \pm 0,8$ do $84,0 \pm 1,4 \text{ g L}^{-1}$) oraz (Tab. 2 w [A5]) procentowy udział albumin praktycznie nie uległ zmianie. Zatem, jak wspomniano we wcześniejszym fragmencie tego rozdziału, jako prawdopodobne wyjaśnienie można sugerować zmniejszenie frakcji wolnej albuminy przy jednoczesnym wzroście albuminy ze związanymi ligandami. Molekuły tej frakcji albuminy rozfałdowują się w zakresie wyższych temperatur, pokrywającym się częściowo z zakresem denaturacji frakcji gammaglobulin takich jak: IgG (immunoglobulin G), IgA (immunoglobulina A), A2M (alfa-2-makroglobulina). Istotna wydaje się zmiana charakteru korelacji między ilością albuminy w surowicy a C_{p1} z dodatniej przed wysiłkiem na ujemną po wysiłku.

W pracy [A4] Fig. 2 przedstawia średnie krzywe DSC surowicy dla czterech etapów sesji ćwiczeń przed zabiegami sauny. Widoczne efekty powysiłkowe są bardzo podobne jak opisane powyżej, odnoszące się do okresu badań przeprowadzonych przed zabiegami WBC. W zakresie temperatur około $45\text{--}60^\circ\text{C}$ (Fig. 2 w [A4]) obserwujemy po wysiłku redukcję pierwszego lokalnego maksimum. Towarzyszy temu wyraźny wzrost intensywności przemiany w zakresie temperatur około $65\text{--}85^\circ\text{C}$ (Fig. 2 w [A4]). Lokalne maksimum w tym zakresie temperatur przesuwają się z $70,8$ do $74,1^\circ\text{C}$ z powodu wykonanego ćwiczenia. Wyniki testu Friedmana wykazały istotne statystycznie różnice między średnimi wartościami T_3 w etapach przed wykonaniem ćwiczeń i po wysiłku dla sesji przed zabiegami. Średnia nadmiarowa pojemność cieplna w temperaturze trzeciego maksimum lokalnego wzrasta w wyniku ćwiczenia z $1,000$

do $1,070 \text{ J g}^{-1} \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}$ (o $0,070 \text{ J g}^{-1} \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}$). Stwierdzono, że różnice pomiędzy średnimi wartościami C_{p3} przed i po wysiłku były istotne statystycznie.

Porównanie krzywych DSC surowic przedstawionych na Fig. 2 w [A4] pozwala zauważyć, że podczas okresu regeneracji następuje powrót do pierwotnego kształtu przejścia denaturacyjnego surowicy. Po godzinie odpoczynku modyfikacje powysiłkowe znikają praktycznie całkowicie. Ponadto egzotermiczny efekt agregacji, który jest dobrze widoczny po wysiłku w zakresie temperatur powyżej $85 \text{ }^{\circ}\text{C}$ zanika w czasie rekonwalescencji.

Jedną z przyczyn zmian powysiłkowych zaobserwowanych w naszym badaniu może być oksydacyjna modyfikacja białek. Wolna grupa -SH albuminy może podlegać utlenieniu, czyli może wychwytywać i neutralizować wolne rodniki między innymi reaktywne formy tlenu. Dlatego wydaje się prawdopodobne, że obserwowane wyraźne zmiany w kształcie przejścia denaturacyjnego surowicy krwi sportowców po wysiłku mogą być związane z tym procesem. Wyniki Bruschi i wsp. [212] potwierdziły termiczną stabilizację struktury albuminy po utlenieniu. Stwierdzono istotne różnice między profilami DSC utlenionej (od pacjentów z ogniskowym segmentalnym stwardnieniem kłębuszków nerkowych) i nieutlenionej albuminy. Zatem powysiłkowy spadek intensywności w niskim zakresie temperatur ($50\text{-}60^{\circ}\text{C}$) części przejścia denaturacji surowicy oraz wzrost C_{pm} odnotowany w bieżących badaniach można przynajmniej częściowo wytłumaczyć wzrostem stężenia utlenionej albuminy. Stosunkowo szybki powrót kształtu przejścia denaturacji surowicy do kształtu profilu sprzed ćwiczeń sugeruje przywrócenie frakcji nieutlenionych cząsteczek albuminy w ciągu dnia odpoczynku. Zgadza się to z wynikami przedstawionymi przez Lamprechta i wsp. [213], że po teście wysiłkowym ludzka merkaptalbumina (HMA; zredukowana) została głównie utleniona do swojej odwracalnej frakcji ludzka niemerktalbumina 1 (HNA1) i 30 godzin wystarczyło do powrotu wartości sprzed treningu białek osocza po modyfikacji oksydacyjnej. Ponadto klirens (współczynniki oczyszczania) utlenionej albuminy w organizmie jest szybszy w porównaniu ze zwykłą albuminą [214]. Wyższy poziom albumin w osoczu stwierdzono u osób po treningu i udokumentowano w publikacjach [215-219]. W pracy Rogera Yunga i współautorów [215], w której zmierzono syntezę albumin wątrobowych po wysiłku i odnotowano wzrost syntezy albumin oraz zmniejszony klirens wolnej wody co przyczynia się do zatrzymywania płynów w krążeniu po intensywnym wysiłku. Zespół Nagashima i innych [216] przetestował hipotezę, że podwyższenie szybkości syntezy albumin przyczynia się do zwiększenia zawartości albumin w osoczu podczas hiperwolemii wywołanej wysiłkiem fizycznym. Zwiększona synteza albumin po intensywnym wysiłku fizycznym przyczynia się do zwiększenia zawartości albuminy i jej utrzymania [216]. Dodatkowo wysnuli wniosek, że bodźce związane z postawą ciała mają kluczowe znaczenie w modulowaniu dążenia do syntezy albuminy po intensywnym wysiłku fizycznym [216]. W pracy Colak i współautorów [217] pokazano, że wymagająca, intensywna aktywność fizyczna beztlenowa może wpływać na generowanie albuminy zmodyfikowanej niedokrwieniem. Grupa Adogu i innych [218] pokazała, że długotrwałe forsowne ćwiczenia aerobowe mogą skutkować wyższymi poziomami albumin w surowicy. Całkowita albumina wzrasta w odpowiedzi na długotrwały wysiłek fizyczny, ponieważ jest niezbędna do mobilizacji wolnych kwasów tłuszczowych, które są preferowanym źródłem paliwa podczas długotrwałych ćwiczeń [219]. Wyniki cytowanych prac mogą potwierdzać naszą sugestię odnośnie dużego wkładu od związanej albuminy.

Ultramaraton jest jednym z najbardziej wymagających sportów pod względem wysiłku mięśniowego, fizjologicznego i charakteryzuje się uwalnianiem czynników prozapalnych oraz generowaniem reaktywnych form tlenu. W organizmie w wyniku ekstremalnego wysiłku następuje wzrost stężenia hormonów w surowicy, zmiany metaboliczne, w tym zwiększony katabolizm białek i ujemny bilans azotu, zmiany w metabolizmie lipidów i żelaza, zmiany w stężeniu kationów w surowicy, leukocytoza, aktywacja dopełniacza i wzrost białek osocza, które są produkowane głównie w wątrobie. Negatywnymi reagentami ostrej fazy są spadek stężenia albuminy, transtyretyny, alfa fetoproteiny, alfa-2 glikoproteiny HS i transferyny. Stan zapalny w wyniku wysiłku fizycznego, jest związany z nieprawidłowościami metabolizmu żelaza, w tym zwiększonym magazynowaniem żelaza w tkankach (zwiększone stężenie ferrytyny w surowicy), zmniejszeniem żelaza w surowicy, całkowitą zdolnością wiązania żelaza (TIBC), transferyna i wysyceniem transferry. Czasami, w następstwie tak ekstremalnego wysiłku, jak ten włożony w wyczerpujący, dłuższy niż maraton (ponad 42 km), długotrwały (nie krócej niż 6 h) bieg, pojawia się nawet odpowiedź ostrej fazy. W pracy Fallon [220] 6-dniowy ultramaraton posłużył jako prototyp ćwiczenia dla poparcia słuszności hipotezy, że odpowiedź hematologiczna i biochemiczna na wysiłek fizyczny jest analogiczna do odpowiedzi ostrej fazy, która występuje w wielu stanach chorobowych. Spośród zmierzonych jedenastu reagentów ostrej fazy, sześć zareagowało tak, jakby wystąpiła odpowiedź ostrej fazy. Były to: żelazo w surowicy, ferrytyny, procentowe wysycenie transferry, białko C-reaktywne, haptoglobina i szybkość sedymentacji erytrocytów. Nie zmienił się natomiast poziom: transferry, albuminy, alfa-1 antytrypsyny i składników dopełniacza 3 i 4 [220].

W naszych badaniach [A6], u wszystkich uczestników ultramaratonu (byli nimi amatorzy biegów długodystansowych) zaobserwowano metodą DSC znaczące zmiany w proteomie surowicy krwi. Stwierdzono wyraźny wpływ dwunastogodzinnego biegu na kształt i parametry przemiany endotermicznej wynikającej z denaturacji białek surowicy. Porównanie uśrednionych krzywych DSC surowic przed i po zakończeniu 12-godzinnego biegu ultramaratonu (Fig. 1 w [A6]), jak i przykładowych krzywych dla wybranych osób (Fig. 2 a-d w [A6]) jednoznacznie pokazuje istotne różnice w omawianym w tym opracowaniu przejściu endotermicznym. Przesuwa się ono w kierunku wyższych temperatur, a jego kształt mocno zmienia się pod wpływem dużego wysiłku włożonego w długi, wyczerpujący bieg. Znaczący spadek intensywności przejścia w zakresie niskich temperatur może świadczyć o spadku niezwiązanej formy albuminy, a prawdopodobnym wzroście jej oksydacyjnie zmodyfikowanych form z powodu stresu oksydacyjnego wywołanego forsownym biegiem. Lokalne maksimum przy około 62 °C nie jest już widoczne, co może sugerować spadek poziomu haptoglobiny. Znany jest fakt, że poziom haptoglobiny zmniejsza się po ćwiczeniach, podczas których dochodzi do hemolizy. We wspomnianych badaniach Fallon [220], poziom haptoglobiny obniżył się w pierwszym dniu, w drugim dniu nie różnił się znacząco od poziomu sprzed biegu, a następnie był podwyższony. W naszym przypadku bieg odbył się w ciągu jednego dnia, więc obydwie obserwacje są zgodne.

Temperatura maksimum przejścia T_m rośnie od wartości 70.9 ± 0.9 do 75.8 ± 2.9 °C, wartość nadmiarowej pojemności cieplnej w maksimum piku od wartości 0.859 ± 0.209 do 1.102 ± 0.226 Jg⁻¹°C⁻¹, a entalpii denaturacji surowicy ΔH od 18.55 ± 6.52 do 22.08 ± 5.61 Jg⁻¹. Typowa dla zdrowych osób, zbliżona do stwierdzonej przez nas wcześniej dla narciarzy biegowych [A3, A5], średnia wartość pierwszego momentu przejścia względem osi temperatury T_{FM} przed biegiem (około 67.0 °C), rośnie aż do wartości 72,6°C po ukończeniu ultramaratonu. Wzrost wartości T_{FM} w różnych stanach chorobowych oraz możliwość użycia

parametru T_{FM} jako wskaźnika zaawansowania choroby sygnalizowano w doniesieniach literaturowych na temat diagnostycznego wykorzystania badań surowicy/osocza metodą DSC [102,104,187,221]. Analiza wyników potwierdziła statystyczną istotność różnic dla wszystkich wymienionych parametrów (T_m ($p = 0,0003$), C_{pm} ($p = 0,00004$), ΔH ($p = 0.04$), T_{FM} ($p = 0.00006$)) pomiędzy etapami „przed biegiem” i „po biegu”.

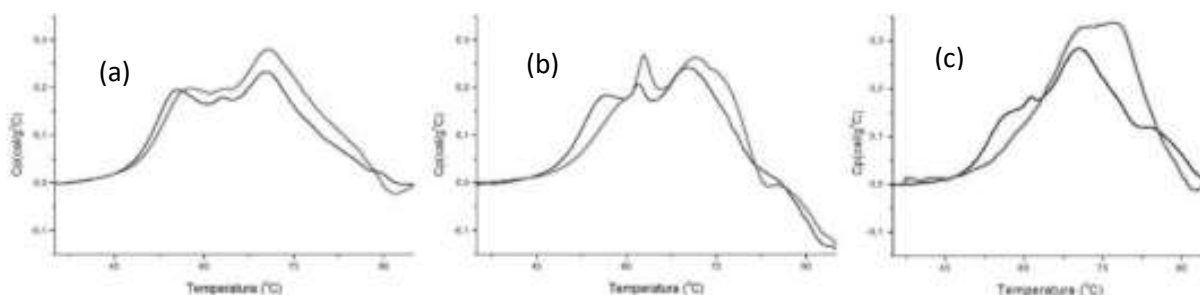
Dodatkowo, znaleziono dodatnią korelację między średnią prędkością biegu uczestnika a różnicą C_{pm} , co sugeruje współczynnik korelacji Pearsona ($r = 0,6$; $p = 0,1$). Statystycznie istotne korelacje stwierdzono jedynie między wiekiem a przedbiegowymi wartościami T_{FM} i HHW. Ponadto, wiek uczestników okazał się ujemnie skorelowany z różnicami między etapami „przed biegiem” i „po biegu” dla wartości entalpii denaturacji surowicy oraz w wartościach HHW. Stwierdzono też, że wartość parametru T_{FM} przed biegiem była istotnie skorelowana z wiekiem uczestnika niniejszego badania. Dodatnia wartość współczynnika korelacji Pearsona ($r = 0,65$) wskazuje na wzrost przedbiegowej wartości T_{FM} wraz z wiekiem. Uśrednione wyniki zaprezentowane w omawianych artykułach pokazały, że istnieje wyraźna tendencja do określonego typu zmian kształtu przejścia endotermicznego związanego z denaturacją surowic sportowców po intensywnym wysiłku. Jednakże we wszystkich badaniach można było zauważyć stosunkowo dużą zmienność osobniczą w reakcji na wysiłek, na co zwrócono uwagę także we wcześniej prezentowanych wynikach badań surowic sportowców podejmujących wysiłek w warunkach hipoksji normobarycznej [188].

Aby lepiej przedstawić różnorodność profili DSC surowic zarejestrowanych w przeprowadzonych badaniach, w dalszej części rozdziału zaprezentowano przykładowe wyniki. Rysunek 24 przedstawia porównanie krzywych przed wysiłkiem i po wysiłku wybranych osób uprawiających: narciarstwo biegowe, CrossFit i biorących udział w ultramaratonie. Trudno było by dopatrzeć się dwóch jednakowych profili DSC przed i po wysiłku w badanych grupach sportowców, odzwierciedlają to charakterystyki na rysunku 24. Ze względu na zmienność osobniczą proteomu surowicy krwi, każdy ma swój unikatowy przebieg krzywej DSC i indywidualną reakcję na wysiłek. Niektóre z pokazanych przykładów wyraźnie odbiegają od uśrednionych wyników zaprezentowanych w opublikowanych artykułach.

W przypadku wybranego narciarza biegowego (rys. 24 (a)) można zaobserwować wyraźnie zarysowane pierwsze maksimum lokalne przed jak i po wysiłku. Po wysiłku, drugie maksimum lokalne uległo wypłaszczeniu, natomiast trzecie maksimum lokalne zwiększyło swoją intensywność.

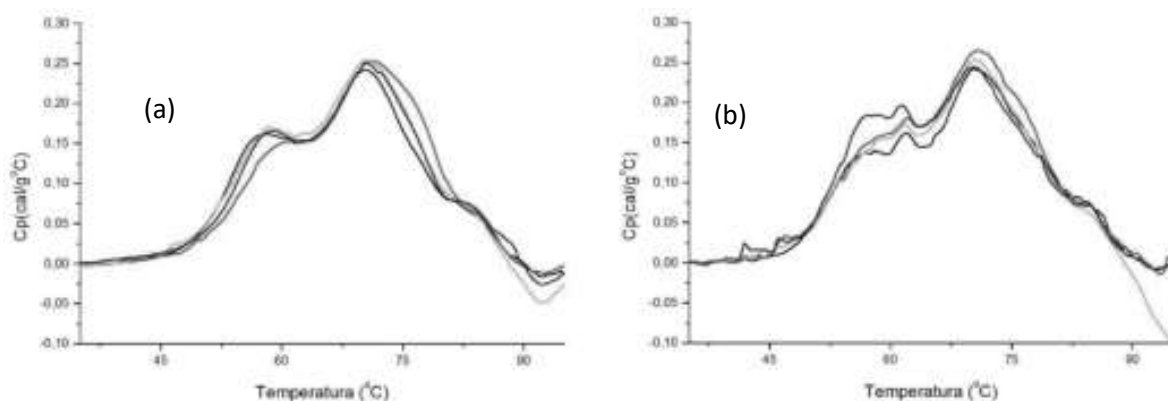
Na krzywych przykładowej osoby ćwiczącej CrossFit (rys. 24 (b)) efekt wysiłku jest bardzo dobrze widoczny w przeciwieństwie do omówionych wcześniej uśrednionych krzywych sportowców z tej grupy doświadczalnej. Po wysiłku obserwujemy przede wszystkim redukcję pierwszego maksimum lokalnego oraz wyraźny wzrost intensywności drugiego i trzeciego maksimum. Wyraźny wzrost intensywności Cp_2 sugeruje wzrost poziomu haptoglobiny, białka ostrej fazy (dającej głównie wkład do drugiego maksimum lokalnego). Może to świadczyć o pojawieniu się stanu zapalnego, np. w wyniku mikro urazu po intensywnym wysiłku. Należy jednak pamiętać, że zjawisko hemolizy może maskować zmiany haptoglobiny, podobnie jak zmiany objętości osocza utrudniają ocenę poziomu albumin [220]. Porównanie przejścia endotermicznego przed i po wysiłku wyraźnie wskazuje na wzrost parametru T_{FM} . Dodatkowo, po wysiłku obserwujemy pojawienie się ramienia czwartego piku przy temperaturze około 85°C.

Rys. 24 (c) dobrze reprezentuje profile DSC surowicy krwi osób, które przebiegły ultramaraton – wśród całej grupy obserwowaliśmy podobne zmiany kształtu po zakończeniu biegu ultra. Na krzywej wyjściowej obserwujemy zarysowane ramię pierwszego maksimum lokalnego oraz wyraźne dwa maksima lokalne – drugie maksimum lokalne oraz trzecie maksimum lokalne. Profil przejścia po wysiłku nie posiada pierwszego maksimum lokalnego tylko jeden główny, szeroki pik, którego maksimum jest wyraźnie przesunięte w kierunku wyższych temperatur. Osoby startujące w biegach ultra wywodzą się z biegów maratońskich, w których nadal uczestniczą. Wieloletnie treningi do biegów maratońskich, a potem do biegów ultra wpłynęły na kształt wyjściowej krzywej, a sam dwunastogodzinny wyczerpujący bieg wpływa bardzo mocno na kształt krzywej po wysiłku.



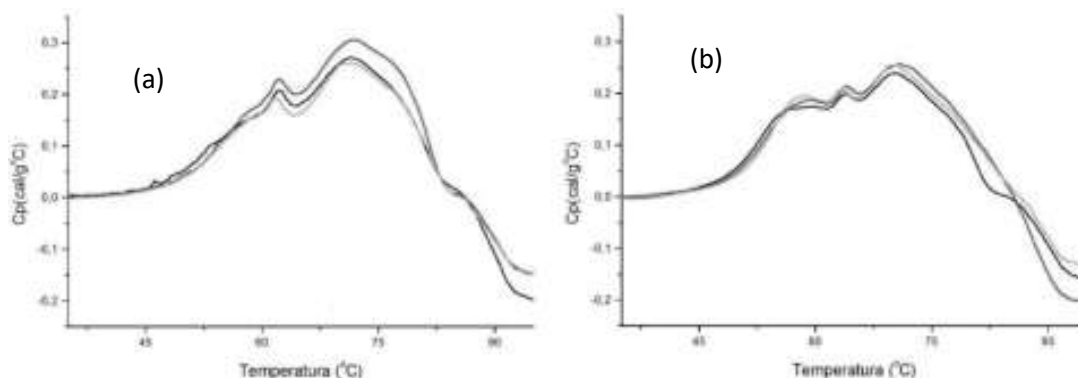
Rysunek 24 Porównanie krzywych DSC surowic wybranych osób uprawiających sporty: (a) narciarstwo biegowe, (b) CrossFit, (c) ultramaraton; na wszystkich panelach kolorem czarnym oznaczona jest krzywa wyjściowa, kolorem czerwonym krzywa po wysiłku.

Wykonane badania pozwoliły także na obserwację zróżnicowanej odpowiedzi organizmów na regenerację po wysiłku, prezentują to rysunki 25 i 26. Rysunek 25 przedstawia porównanie profili DSC narciarza biegowego z testów wysiłkowych w sesjach (a) przed serią zabiegów kriostymulacji i (b) przed serią zabiegów sauny. Krzywe pochodzą od tego samego narciarza biegowego z następujących rok po roku okresów przygotowawczych do sezonów startowych. Warto zwrócić uwagę na zupełnie różne kształty złożonego przejścia endotermicznego na krzywych DSC surowic krwi tego sportowca. Na krzywych z testu wysiłkowego przed zabiegami kriostymulacji (a) możemy zobaczyć dwa maksima lokalne pierwsze i trzecie. Po wysiłku obserwujemy redukcję pierwszego maksimum lokalnego, sygnalizującego spadek poziomu wolnej albuminy i niewielkie przesunięcie w kierunku wyższych temperatur piku składowego pochodzącego głównie od immunoglobulin. Możemy zauważyć szybką regenerację po wysiłku – już po jednej godzinie odpoczynku krzywa powróciła do wyjściowego kształtu. Niewielka reakcja na wysiłek i szybka regeneracja mogą być spowodowane bardzo dobrym wytrenowaniem sportowca w czasie prowadzonego eksperymentu. Na panelu (b) wyników testu wysiłkowego przed zabiegami sauny możemy zobaczyć, że krzywe posiadają wszystkie trzy maksima lokalne. Po wysiłku obserwujemy redukcję pierwszego maksimum lokalnego i niewielkie rozbudowanie przejścia endotermicznego w obszarze trzeciego piku składowego. Jeszcze po jednej godzinie odpoczynku obserwowaliśmy redukcję pierwszego maksimum lokalnego. Patrząc całościowo na panel (b) w części niskotemperaturowej widzimy powolny powrót do wyjściowego kształtu, a w części wysokotemperaturowej szybki powrót do początkowego poziomu i kształtu. Profil po dobie odpoczynku jest nietypowy, posiada wyraźnie zarysowany pierwszy pik składowy przejścia, i cała część niskotemperaturowa charakteryzuje się większą intensywnością pojemności cieplnej niż na profilu wyjściowym. Trudno znaleźć wyjaśnienie tej obserwacji.



Rysunek 25 Porównanie krzywych DSC surowic narciarza biegowego: czarna -krzywa wyjściowa, czerwona – krzywa po wysiłku, zielona – krzywa po 1h odpoczynku, niebieska – krzywa po 24h odpoczynku; (a) wysiłek przed zabiegami kriostymulacji, (b) wysiłek przed zabiegami sauny

Rysunek 26 przedstawia porównanie profili DSC surowic z okresu odpoczynku po teście wysiłkowym dwóch osób (a) i (b) uprawiających CrossFit. Na panelu (a) wszystkie trzy krzywe posiadają przejście, na którym widoczne są tylko dwa maksima lokalne, drugie i trzecie. Już na krzywej wyjściowej nie ma wyraźnego pikę od wolnej albuminy. Po wysiłku, pik w okolicy 70 C, pochodzący od gammaglobulin i ligandowanej frakcji albuminy, mocno urósł i poszerzył się. Po godzinie odpoczynku obserwujemy powrót do kształtu wyjściowego, co oznacza szybką regenerację po wysiłku. Panel (b) przedstawia profile osoby, u której wysiłek spowodował niewielkie zmiany w kształcie przejścia, które jednak utrzymują się po godzinie odpoczynku. Obydwa zaprezentowane przykłady dobrze reprezentują wyniki uzyskane dla grupy uczestników eksperymentu. Ze względu na bardzo męczący charakter treningu CrossFit można przypuszczać, że tak niewielkie zmiany w profilach badanych są spowodowane dobrą adaptacją do wysiłku dzięki bardzo dobrej kondycji fizycznej i plastyczności układu immunologicznego sportowców.



Rysunek 26 Porównanie krzywych DSC surowic dwóch osób uprawiających CrossFit (a) i (b): czarna – krzywa wyjściowa, czerwona – krzywa po wysiłku, zielona – krzywa po 1h odpoczynku

Rysunki 25 i 26 pokazują jak różnorodne odpowiedzi na wysiłek i regenerację po wysiłku możemy obserwować. Odpoczynek jest tak istotny, ponieważ do dwóch godzin po zakończonej aktywności nasz metabolizm pracuje na wyższych obrotach. Regeneracja to odbudowa uszkodzonych komórek, oraz ich wzrost. Organizm pracuje, aby odnowić uszkodzenia włókien mięśniowych, które powstają podczas wzmożonej aktywności fizycznej. Podczas regeneracji dochodzi także do nadbudowy, przez co mięśnie zwiększają swoją objętość. Proces regeneracji mięśni u osób ćwiczących charakteryzuje się aktywacją szeregu

cząsteczek wydzielanych przez miocyty i towarzyszące komórki macierzyste, komórki immunologiczne oraz komórki śródbłónka naczyń. Aktywowane są między innymi takie czynniki zaangażowane w odbudowę tkanki mięśniowej: IGF-1 (insulinopodobny czynnik wzrostu 1), PDGF (płytkopochodny czynnik wzrostu) oraz BDNF (neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego) [222].

W publikacjach [A1, A3, A4] również zwrócono uwagę na szybkość regeneracji po wysiłku oraz przedyskutowano to zagadnienie w oparciu o uśrednione wyniki. Niestety, w artykule poświęconym ultramaratonowi [A6] nie poruszono tego problemu. Ze względu na brak próbek krwi uczestników badania z okresu rekonwalescencji po ukończeniu biegu, nie było możliwości sprawdzenia szybkości regeneracji po tak długim, intensywnym i wyczerpującym wysiłku. Jest to duża strata badawcza, ponieważ zmiany zaobserwowane w analizowanym przejściu endotermicznym w wyniku ukończenia ultramaratonu były bardzo wyraźne i z pewnością obserwacja ich cofania się w trakcie okresu regeneracji byłaby bardzo interesująca. Technika DSC świetnie nadawałaby się do realizacji takiego celu.

4.3. Wpływ stosowania w trakcie treningu suplementacji lub zabiegów odnowy biologicznej na zmiany zachodzące w surowicy krwi odzwierciedlone w profilach DSC

Osoby uprawiające sport zarówno zawodowo jak i amatorsko w celu poprawy wyników i regeneracji organizmu po wysiłku lub urazach często łączą treningi z dietą suplementowaną oraz zabiegami odnowy biologicznej. Interesującym problemem badawczym jest określenie czy stosowanie suplementacji oraz zabiegów odnowy biologicznej w trakcie intensywnego treningu sportowego wpływa na zmiany zachodzące w surowicy krwi oraz charakterystyka czynników, które te zmiany determinują. Aby sprawdzić, czy zachodzące na skutek wspomagania treningu zmiany między innymi w składzie chemicznym surowicy krwi są odzwierciedlone w formie zmiany kształtu jej profilu DSC, w prowadzonych badaniach wykorzystano próbki kliniczne pobrane od osób intensywnie trenujących, u których uzupełnieniem treningu były:

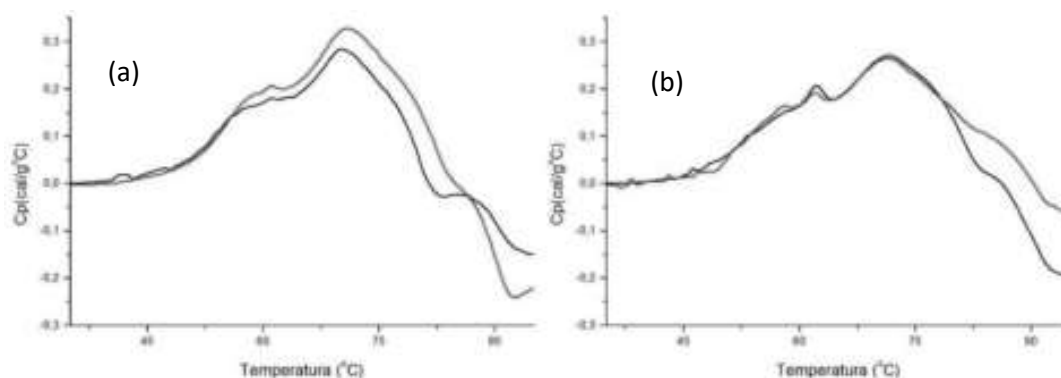
- 1) suplementacja ekstraktem z zielonej herbaty (GTE) - badaniem objęto osoby uprawiające CrossFit (CF)
- 2) zabiegi kriostymulacji ogólnoustrojowej (zabiegi odnowy biologicznej) - badaniem objęto narciarzy biegowych,
- 3) zabiegi sauny fińskiej(zabiegi odnowy biologicznej) - badaniem objęto narciarzy biegowych.

Suplementacja

Odpowiednia suplementacja sportowców stanowi niezwykle ważny element wpływający na zdrowie i samopoczucie. Przekłada się również na lepsze efekty treningowe i osiąganie dobrych wyników. Ekstrakt zielonej herbaty jest naturalnym wyciągiem bogatym w Polifenole (95%) i EGCG (50%). Uwalnia organizm od wolnych rodników, wspomagając tym samym funkcjonowanie całego organizmu. Rezultaty badań metodą DSC w zakresie wpływu suplementacji GTE w trakcie treningu na zmiany zachodzące w surowicy krwi dotyczą parametrów termodynamicznych obserwowanego przejścia endotermicznego związanego z denaturacją białek surowicy. Materiał do badań stanowiły próbki pobrane od grupy osób, którym podawano substancje o efekcie placebo (C) oraz osób, których dieta była wzbogacona suplementacją ekstraktem z zielonej herbaty (S). Wszystkie suplementy podawano w miękkich kapsułkach żelatynowych (Olimp Labs, Dębica, Polska) w dawce 2 kapsułki raz dziennie przez 6 tygodni. Jedna kapsułka placebo zawierała celulozę mikrokrystaliczną, stearynian magnezu i maltodekstrynę zamiast ekstraktu roślinnego. Jedna kapsułka GTE zawierała 250 mg standaryzowanego GTE (245 polifenoli, w tym 200 mg katechin wśród 137 mg epigallokatechin-3-galusanu) oraz dodatkowe substancje, takie jak maltodekstryna, celuloza mikrokrystaliczna i stearynian magnezu. W przypadku wystąpienia zdarzeń niepożądanych związanych z suplementami diety, wszyscy badani mogli zrezygnować z udziału w tym badaniu. Ochotnicy biorący udział w eksperymencie dwukrotnie uczestniczyli w teście wysiłkowym na ergometrze rowerowym (Sport Excalibur), tj. przed treningiem i suplementacją CF (pierwsza sesja), a następnie ponownie po sześciu tygodniach treningu i suplementacji CF (druga sesja). Po krótkiej rozgrzewce, uczestnicy jechali w 3-minutowych fazach, zaczynając od mocy wyjściowej 40 W i stopniowo zwiększającej się o 40 W. Ćwiczenia wysiłkowe były kontynuowane aż do wyczerpania.

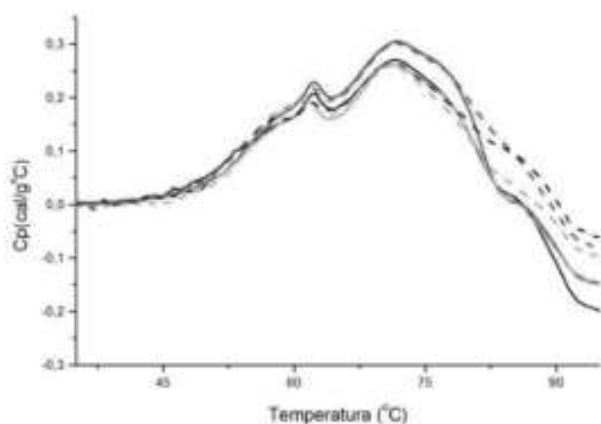
Oznaczone w badaniu [A1] biomarkery krwi wskazują, że przed treningiem CF średnie wartości stężenia LA i aktywności CK były zbliżone w obu grupach. Poziom LA znacząco wzrósł po wysiłku w obu próbach w obu grupach. Najwyższa aktywność CK wystąpiła w grupie C po wysiłku wykonanym w drugiej sesji. Różnice między tą wartością CK a wszystkimi wartościami (przed treningiem, po wysiłku i po regeneracji) w pierwszym badaniu dla grupy C okazały się istotne statystycznie. Ogólnie zaobserwowano nieco wyższe powysiłkowe wartości CK w porównaniu z innymi fazami eksperymentu. Wydaje się ważne, że wystąpiły przeciwne tendencje zmian aktywności CK w grupach kontrolnej i suplementowanej: wzrost w pierwszej i spadek w drugiej z wymienionych grup. Analiza statystyczna wykazała istotne różnice między grupami C i S pod względem aktywności CK po treningu dla wszystkich etapów eksperymentu. Dla grupy uzupełnionej GTE, po ćwiczeniach stwierdzono, że aktywność CK przed treningiem była istotnie wyższa niż potreningowa i po 1 h odpoczynku. Wyniki te sugerują, że suplementacja polifenoli z herbaty, w dawkach zalecanych zgodnie z zaleceniami producenta, może zmniejszyć potreningowe uszkodzenia mięśni szkieletowych poprzez działanie hamujące stres oksydacyjny i stany zapalne [223].

Jak opisano w poprzednim rozdziale, uśrednione efekty odbycia treningu CrossFit znalazły słabe odzwierciedlenie w krzywych DSC surowic krwi jego uczestników. Bardzo małe różnice pomiędzy średnimi krzywymi DSC odpowiadającymi surowicy z etapu spoczynkowego przed i po treningu CrossFit wydają się mieć jednak nieco inny charakter dla kontrolnej grupy placebo C niż dla suplementowanej S (Fig. 2 w [A1]). Dodatkowo, w pojedynczych przypadkach można było zaobserwować znaczne różnice w profilach DSC surowicy uczestników po treningu CF i suplementacji GTE. Przykłady takich znaczących różnic pokazano w pracy ([A1] Fig. 3 a,b) odpowiednio dla wybranych uczestników z grup C i S. Spadek intensywności C_{p2} jest dobrze widoczny dla reprezentanta z grupy placebo (Fig. 3a w [A1]). W przypadku osoby suplementowanej, po treningu pojawiły się zmiany i wzrost intensywności przejścia w zakresie temperatur 55–65 °C (Fig. 3b w [A1]). Kolejny przykład indywidualnych reakcji zaprezentowano na rysunku 27, który przedstawia porównanie profili po treningu dwóch osób uprawiających CrossFit: (a) osoby otrzymującej placebo i (b) osoby suplementowanej GTE. W przypadku osoby otrzymującej placebo (a), zmiany w krzywej DSC surowicy są wyraźne, w charakterze bardzo podobne do typowych zmian powysiłkowych. Natomiast w przypadku osoby suplementowanej GTE (b) możemy zobaczyć, że krzywa wyjściowa i po treningu pokrywają się ze sobą do około 78°C. Powyżej 80°C obserwujemy różnicę polegającą na braku wkładu od przejścia egzotermicznego na krzywej DSC surowicy po treningu połączonym z suplementacją. Jest to korzystny efekt, ponieważ oznacza zmniejszoną tendencję do agregacji białek surowicy w tym zakresie temperatur.



Rysunek 27 Porównanie profili DSC surowic po treningu CrossFit dwóch osób czarna krzywa - wyjściowa, czerwona krzywa - po treningu; (a) osoba przyjmująca placebo, (b) osoba przyjmująca GTE

Na rysunku 28 przedstawiono porównanie profili DSC surowic osoby uprawiającej CrossFit w sesji przed i po suplementacji ekstraktem z zielonej herbaty. W obydwu sesjach krzywe z etapu powysiłkowego są podobne – w stosunku do etapu wyjściowego widzimy wzrost intensywności drugiego i trzeciego maksimum lokalnego, praktycznie na tym samym poziomie. Zarówno przed suplementacją jak i po suplementacji GTE obserwujemy już po jednej godzinie odpoczynku powrót do wyjściowego kształtu krzywej. W obszarze wysokotemperaturowym powyżej 80°C na krzywych wyjściowej i po wysiłku w sesji II widzimy zarysowane ramię. Po jednej godzinie odpoczynku w sesji II ramię to jest słabo widoczne. Suplementacja zieloną herbatą u tej osoby nie wpłynęła na zmniejszenie reakcji na wysiłek i na szybkość regeneracji.



Rysunek 28 Porównanie profili DSC surowic osoby uprawiającej CrossFit, linia ciągła sesja I przed suplementacją GTE, linia przerywana sesja II po suplementacji GTE; czarna krzywa – wyjściowa, czerwona krzywa – po wysiłku, zielona krzywa – po 1h odpoczynku.

Zestawy uśrednionych krzywych: dla grupy placebo przed treningiem (Fig. 4 w [A1]) oraz dla grupy suplementowanej GTE po treningu (Fig. 5 w [A1]) pokazują, że niewielkie zmiany powysiłkowe znikają po godzinie odpoczynku.

Fig. 6 w [A1] wskazuje na podobny charakter zależności T_1 , T_2 i T_3 od etapu eksperymentu w grupach C i S i niezależnie od odbycia treningu. W obu grupach w obu próbach wartość T_1 po wysiłku jest nieco niższa, podczas gdy T_2 i T_3 po wysiłku są wyższe niż przed wysiłkiem. Nie stwierdzono jednak żadnych istotnych różnic w wartościach T_m ($m = 1, 2, 3$) między obiema grupami w odpowiednich okresach badania.

Zmiany w parametrach C_{p1} , C_{p2} , C_{p3} (Fig. 7 w [A1]) związane z etapem eksperymentu wydają się różne dla obu grup (C i S), jednak różnice te nie są istotne statystycznie. Natomiast dla parametru C_{p2} uzyskano ciekawe wyniki. Wartość C_{p2} dla grupy S po treningu i suplementacji utrzymuje się na wyższym, stałym poziomie niż w pierwszej próbie. Zgodnie z ANOVA z powtarzanymi pomiarami różnice między średnimi wartościami C_{p2} dla poszczególnych etapów są istotne statystycznie ($p = 0,047$). Dane uzyskane dla obu grup wskazują, że przedwysiłkowe C_{p2} w pierwszej sesji okazało się istotnie niższe niż powysiłkowe po treningu ($p = 0,02$ w teście post hoc Tukey'a).

Znaleziono istotne ujemne korelacje między VO_{2max} po treningu CF a powysiłkowym T_2 ($r = -0,52$; $p = 0,03$) oraz powysiłkowym C_{p2} ($r = -0,68$; $p = 0,03$) po treningu. Pierwsza z wymienionych korelacji była jeszcze wyższa w grupie kontrolnej ($r = -0,78$), a druga w grupie suplementowanej ($r = -0,86$). Sugeruje, to że wyższe VO_{2max} po treningu CF implikuje mniejszy powysiłkowy wzrost T_2 i C_{p2} po treningu.

Wartości zmian entalpii denaturacji surowicy (ΔH) w poszczególnych etapach badania okazały się bardzo podobne dla obydwu grup, a szerokości przejścia HHW większe dla grupy S (Fig. 8 i 9 w [A1]). Zaobserwowano wzrost ΔH i HHW po wysiłku oraz spadek po okresie odpoczynku. Statystycznie istotne różnice stwierdzono dla parametru HHW ze względu na czynniki „grupa” i „etap” (odpowiednio $p = 0,004$ i $p = 0,01$). Dodatkowo test post hoc Tukey'a ujawnił istotnie szersze przejście denaturacji surowicy w fazie powysiłkowej w drugiej sesji dla grupy S niż we wszystkich stadiach dla grupy C, z wyjątkiem tych po wysiłku.

Forsowne ćwiczenia fizyczne mogą wywoływać stres oksydacyjny, a suplementacja przeciwutleniaczami może wspierać wewnątrzustrojowy system obronny i zmniejszać stres oksydacyjny, uszkodzenia mięśni i poprawiać wyniki ćwiczeń. Wyniki badania [A1] w pewnym stopniu potwierdzają ten pogląd. Uzyskane dane biochemiczne pozwoliły zaobserwować, że suplementacja GTE równoległa z forsownym treningiem CF zapobiega potreningowemu wzrostowi aktywności kinazy kreatynowej (CK). Wzrost CK był widoczny w grupie placebo. Dane biochemiczne i kalorymetryczne ujawniły związek między intensywnością VO_{2max} i C_{p2} . Wyniki analizy statystycznej wskazują na istotną ujemną korelację między tymi zmiennymi. Ogólne dane przedstawione badaniu [A1] sugerują, że pod względem VO_{2max} katechiny nie poprawiają wydolności fizycznej u aktywnych fizycznie, dobrze wytrenowanych mężczyzn.

W pracy Sadowska-Krępa i inni 2019 [159] pokazano, że sześciotygodniowe spożywanie ekstraktu z zielonej herbaty miało jedynie marginalny wpływ na wydolność tlenową i poziom neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgowego w surowicy mężczyzn trenujących CrossFit. Odnotowano znaczny wzrost zdolności antyoksydacyjnej krwi i umiarkowane osłabienie peroksydacji lipidów wywołanej treningiem CrossFit. Wyniki zespołu Sadowskiej-Krępy [159] pokazują, że nie można podać ogólnych zaleceń dotyczących dziennego spożycia ekstraktu z zielonej herbaty przez przeszkolonych mężczyzn. Dobór dawek powinien być dostosowany do indywidualnych potrzeb. W pracy Reza Bagheri i innych 2020 [224] pokazano, że w przypadku mężczyzn w średnim wieku z nadwagą połączenie suplementacji GTE i treningu wytrzymałościowego daje korzystne efekty przeciwzapalne i metaboliczne.

Zabiegi odnowy biologicznej

Kriostymulacja ogólnoustrojowa (WBC)

Zabiegi odnowy biologicznej dla sportowców to ważny element przygotowań do startów w zawodach oraz wspomagania regeneracji po ich zakończeniu. W wyniku wspierania naturalnych mechanizmów odnowy komórkowej, zabiegi przywracają organizmowi gotowość do kolejnych sportowych wyzwań. Opublikowano wiele prac naukowych oraz artykułów przeglądowych na temat stosowania zabiegów kriostymulacji [225-228] czy sauny [229-231]. Można w nich znaleźć cenne, w kompetentny sposób dyskutowane informacje na temat fizjologicznych reakcji występujących po tych zabiegach, korzyści, a także ewentualnych zagrożeń wynikających z ich stosowania.

W ramach badań związanych z bieżącą pracą doktorską, zabiegi kriostymulacji całego ciała wykonywano codziennie o tej samej godzinie, pięć dni w tygodniu, od poniedziałku do piątku przez dwa tygodnie. Pojedynczy zabieg kriostymulacji trwał 3 minuty w temperaturze -130°C . Wejście do komory głównej było poprzedzone 30-sekundowym okresem adaptacyjnym w przedsionku w temperaturze -60°C . Kolejno sportowcy szli do komory właściwej, gdzie poruszali się powoli po okręgu, jeden po drugim, bez wzajemnego kontaktu, bez dodatkowych ruchów i rozmów. Po minucie zalecano zmianę kierunku ruchu.

Wyniki badań DSC zamieszczone w artykule [A2] wskazują, że kriostymulacja całego ciała wpływa na surowicę krwi profesjonalnych narciarzy biegowych w sposób uchwytany tą techniką. Wprawdzie uśredniony kształt przejścia odzwierciedlającego przemianę endotermiczną związaną z denaturacją surowicy zmienia się tylko nieznacznie po serii 10 zabiegów kriostymulacji (Fig. 1 w [A2]), ale w zakresie niskich temperatur tego przejścia stwierdzono istotny statystycznie spadek średniej wartości C_{p1} . Region nisko temperaturowy odpowiada głównie denaturacji niezligowanej albuminy, wynik sugeruje zatem spadek tej postaci albuminy. Z drugiej strony, wyniki oznaczenia elektroforetycznego wskazują na wzrost całkowitego poziomu albuminy po dziesięciu zabiegach WBC. Prawdopodobnym wyjaśnieniem tego efektu jest zmniejszenie liczby cząsteczek albumin wolnych od ligandów, któremu towarzyszy wzrost frakcji albuminy ze związanymi ligandami, w tym utlenionej albuminy. Ekspozycja na WBC powoduje podwyższony metabolizm w celu zwiększenia produkcji ciepła w celu ochrony rdzenia ciała. Krew jest intensywnie wzbogacona w składniki odżywcze, enzymy i tlen. W ten sposób dostępnych jest więcej ligandów do wiązania się z albuminą. Może to prowadzić do wzrostu stosunku zligandowanych do niezwiązaných cząsteczek albuminy. Rosnąca frakcja utlenionej formy albuminy surowicy jest zgodna z faktem, że kriostymulacja pomaga wytworzyć dodatkowe cząsteczki tlenu w krwiobiegu, co sugeruje wzrost ilości utlenionych cząsteczek albuminy. Gorobets i współautorzy 2017 [232] w swojej pracy przedstawili, że entalpia denaturacji utlenionych cząsteczek albuminy jest niższa niż dla nieutlenionych. Zgodne jest to ze spadkiem ΔH (choć nieistotnym statystycznie) po dziesięciu zabiegach WBC.

Kriostymulacja jest obecnie postrzegana jako potencjalna strategia wspomagająca zwalczanie otyłości. Podstawowe mechanizmy takiego działania są jednak wciąż słabo wyjaśnione [233]. Stwierdzono istotną statystycznie, wysoką dodatnią korelację między zmianą C_{p1} a względną zmianą masy tkanki tłuszczowej po dziesięciu zabiegach WBC. Podobne korelacje wystąpiły między względną zmianą masy tkanki tłuszczowej po dziesięciu zabiegach WBC a odpowiednimi zmianami w poziomach alfa2-globulin i beta2-globulin, co sugeruje

obniżenie poziomu białek z tych frakcji w odpowiedzi na utratę masy tłuszczu jako wynik kriostymulacji.

Fig. 2 w [A3] ilustruje średnie krzywe DSC surowicy przed wysiłkiem gdy nie zastosowano WBC i po serii dziesięciu zabiegów WBC oraz różnice między krzywymi po i przed wysiłkiem. Widoczne są pewne różnice między średnimi przed-wysiłkowymi krzywymi DSC w sesji I oraz sesji II po serii 10 zabiegów WBC. Reakcja na wysiłek, odzwierciedlona w zmianach pojemności cieplnej surowicy, jest podobna w obydwu sesjach.

W Tabeli 4 [A3] przedstawiono średnie ($\pm$ SD) wartości parametrów termodynamicznych w kolejnych etapach cyklu treningowego (przed i po wysiłku, po 1 godz. i 24 godz. odpoczynku) w sesji po serii 10 zabiegów WBC. Po włączeniu kriostymulacji zaobserwowano niższe wartości C_{p1} zarówno przed ($p = 0,02$), jak i po wysiłku ($p = 0,04$) w porównaniu z odpowiednimi etapami w sesji przed zabiegami. Porównując wyniki przeprowadzonych analiz ANOVA z powtarzanymi pomiarami dla wartości parametrów uzyskanych w różnych etapach sesji przed i po zabiegach WBC, zaobserwowano mniej statystycznie istotnych różnic w sesji po zabiegach. Stwierdzono istotność statystyczną tylko dla C_{p1} między etapami: po wysiłku i dobie odpoczynku ($p = 0,018$) oraz dla T_3 między etapem po wysiłku i wszystkimi innymi etapami ($p < 0,005$).

W artykule [A3] przedstawiono bardziej szczegółową analizę wpływu zabiegów WBC na powysiłkowe zmiany surowicy z podziałem, grupy narciarzy biegowych na dwie podgrupy: mocniej i słabiej reagujących na wysiłek. Na Fig. 3 [A3] przedstawiono różnice w trendach zmian powysiłkowych obserwowane dla obu grup w wyniku stosowania kriostymulacji. W grupie z silniejszą reakcją na wysiłek dało się zauważyć jej zmniejszenie po zastosowaniu WBC. Porównanie krzywych przedstawionych na Fig. 4 wskazuje, że w sesji po zastosowaniu zabiegów WBC regeneracja po wysiłku była prawie całkowita po godzinie odpoczynku.

Ważnym parametrem w analizie rozpatrywanego przejścia endotermicznego jest stosunek wartości C_{p3} do C_{p1} . Jak stwierdzono na podstawie danych zawartych w Tabelach 3 i 4 w artykule [A3], wzrasta on znacząco ($p < 0,01$) po wysiłku w obu sesjach eksperymentalnych, przeprowadzonych przed i po zastosowaniu WBC. Następnie, podczas odpoczynku wartość C_{p3}/C_{p1} spada i powraca do wartości wyjściowej po dobie odpoczynku, jeżeli nie zastosowano WBC, a już po jednej godzinie odpoczynku, jeśli zastosowano WBC. Ponadto, dla wyników odpowiadających sesji wzbogaconej o WBC znaleziono wysokie, istotne statystycznie korelacje między stosunkiem C_{p3}/C_{p1} a parametrami takimi jak: wzrost ($r = -0,84$; $p = 0,009$), masa mięśni szkieletowych ($r = -0,8$; $p = 0,018$), masa tkanki tłuszczowej/% ($r = 0,79$; $p = 0,02$) oraz masa ciała ($r = -0,76$; $p = 0,03$).

Wyniki przedstawione w Tabeli 1 [A5] wskazują na zmiany parametrów analizowanego przejścia endotermicznego po wysiłku, a następnie na powrót do wartości wyjściowej po odpoczynku. Po zastosowaniu WBC różnice okazały się istotne statystycznie tylko dla T_3 ($p=0,001$ w teście Friedmana).

Zabiegi WBC korzystnie wpływają na regenerację po wysiłku wykazując efekty takie jak: zmniejszenie bólu, obrzęku i stanu zapalnego [234]. Głównie WBC może korzystnie wpływać na regenerację w krótkim okresie [235-236]. Natomiast sportowcy są zainteresowani przede wszystkim strategiami zwiększania długoterminowych odpowiedzi w całym cyklu treningowym. Głównym problemem jest to, czy WBC może utrudniać adaptacyjne reakcje na

trening. Kilka grup badawczych w ostatnich latach (2018-2021) zbadało potencjalny wpływ regularnego stosowania WBC na adaptację do treningu. Praca Broatch i innych 2019 [237] przedstawia, że trzytygodniowe zabiegi WBC nie wpłynęły na adaptację do 4-tygodniowego programu rowerowego obejmującego sesje interwałowe o wysokiej intensywności. Grupa Jaworskiej i współautorów 2020 [238] przedstawiła również wyniki wskazujące, że powtarzające się zabiegi WBC (trzy razy w tygodniu przez 4 tygodnie) mogą wspierać wzrost siły poprzez obniżony poziom miostatyny, negatywnego mediatora adaptacji mięśni.

Sauna fińska

Dziesięć zabiegów sauny fińskiej przeprowadzano popołudniu po części codziennych treningów w fazie przejściowej. Jedna sesja w saunie składała się z trzech etapów przegrzania ciała, każdy trwający od 10 do 15 minut, po których następowały przerwy na ochłodzenie ciała.

Uzyskane wyniki DSC (Fig. 1 w [A4]) wskazują, że seria dziesięciu zabiegów w saunie nie modyfikuje znacząco przejścia denaturacji surowicy na etapie wyjściowym. W Tabeli 1 w artykule [A4] porównano uśrednione parametry przejścia denaturacyjnego surowicy przed zabiegami sauny, po jednym zabiegu i po serii dziesięciu zabiegów sauny. Przedstawione dane sugerują, że po serii zabiegów w saunie wartości C_{p1} i HHW są wyższe, podczas gdy C_{p3} jest nieco niższe. Wartość parametru T_{FM} po zabiegach w saunie jest niższa niż przed zabiegami, co wskazuje na korzystny wpływ sauny na sportowców. Stwierdzono istotną statystycznie różnicę między T_{FM} przed sauna i po jednym zabiegu w saunie (ANOVA z powtarzanymi pomiarami $p = 0,017$; Test post hoc Tukey'a $p = 0,013$). Wyniki sugerują, że efekt jednego zabiegu wydaje się być silniejszy niż cała seria zabiegów.

Znane są pozytywne efekty stosowania sauny fińskiej, głównie jest to redukcja dolegliwości bólowych poprzez rozluźnienie naciągniętych mięśni i usprawnienie ruchomości stawów [180,182]. Bardzo interesującym tematem jest aklimatyzacja do adaptacji cieplnej [239-241] w celu zwiększania wydolności sportowca w zakresie aktywności treningowej i startowej w warunkach gorących.

Fig. 3 w pracy [A4] przedstawia średnie krzywe DSC surowicy dla czterech etapów w sesji ćwiczeń po serii 10 zabiegów w saunie (sesja II). W zestawieniu z Fig. 2 w tej samej pracy, ilustrującym analogiczne krzywe w sesji przed zabiegami (sesja I), pozwala zauważyć znacząco większe zmiany powysiłkowe w sesji po zabiegach sauny. Wartość nadmiarowej pojemności cieplnej w temperaturze pierwszego lokalnego maksimum ($56,5^{\circ}\text{C}$ w SII) zmniejsza się po wysiłku o $0,193 \text{ J g}^{-1} \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}$ (od $0,703$ do $0,510 \text{ J g}^{-1} \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}$). Towarzyszy temu wyraźny wzrost intensywności przemiany w zakresie temperatur około $65\text{--}85^{\circ}\text{C}$. Lokalne maksimum w tym zakresie temperatur zmienia się od $70,3$ do $71,1^{\circ}\text{C}$ w sesji po zabiegach sauny z powodu wykonanych ćwiczeń. Wyniki testu Friedmana wykazały istotne statystycznie różnice między średnimi wartościami T_3 w różnych etapach dla sesji II ($p=0,008$). Średnia nadmiarowa pojemność cieplna w temperaturze trzeciego maksimum lokalnego wzrasta w wyniku ćwiczenia z $0,988$ do $1,137 \text{ J g}^{-1} \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}$ (o $0,149 \text{ J g}^{-1} \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}$) w sesji po zabiegach sauny. Stwierdzono, że różnice pomiędzy średnimi wartościami C_{p3} przed i po wysiłku były istotne statystycznie ($p=0,0008$ w sesji II). Krzywe DSC na Fig. 3 w pracy [A4] pokazują, że po godzinie odpoczynku modyfikacje powysiłkowe w dużym stopniu znikają w sesji po zabiegach sauny. Jednakże, zarówno po godzinie jak i dniu odpoczynku można zaobserwować nieznaczne przesunięcie pierwszego lokalnego maksimum w kierunku wyższych temperatur w porównaniu z krzywą wyjściową.

Fig. 4 i 5 w [A4] przedstawiają krzywe DSC dla sportowców, których reakcja była inna niż wskazana przez średnie krzywe DSC przedstawione na rysunkach 2 i 3. Fig. 4 przedstawia typową reakcję na wysiłek, ale brak oznak regeneracji podczas 1 godziny odpoczynku w sesji po serii zabiegów sauny (SII). Ten sportowiec potrzebował więcej czasu, aby cofnąć zmiany w surowicy spowodowane intensywnymi ćwiczeniami wykonywanymi po serii 10 zabiegów sauny. Fig. 5 sugeruje silniejszą niż przeciętna reakcję na ćwiczenia i pomimo tego bardzo szybki proces regeneracji w obu sesjach.

Analiza danych zebranych w tabeli 1 w [A5] pozwoliła wykazać istotnie wyższe wartości C_{p3} i T_{FM} zaobserwowano na etapie po wysiłku w sesji po zabiegach w saunie w porównaniu z WBC na tym samym etapie (odpowiednio $p=0,005$ i $p=0,001$ w teście t-Studenta). Analogiczne różnice utrzymywały się po 1-godzinnym okresie rekonwalescencji (odpowiednio $p=0,01$ i $p=0,01$).

Porównanie wpływu zabiegów WBC i sauny na przejście termiczne surowic krwi sportowców

Metoda DSC [A3, A4, A5] pozwoliła zarejestrować charakterystyczne powysiłkowe zmiany w przejściach termicznych denaturacji surowicy. Zastosowanie WBC [A3, A5] u dobrze wytrenowanych narciarzy biegowych zmodyfikowało ich reakcję na wysiłek fizyczny (Fig. 2, 3 w [A3], Fig. 1 w [A5]) i poprawiło regenerację po wysiłku (Fig. 4 w [A3], Fig. 2 w [A5]). Po wykonaniu łącznie serii dziesięciu kriostymulacji całego ciała, intensywność reakcji na wysiłek uległa zmniejszeniu u większości sportowców z badanej grupy. Natomiast zabiegi sauny [A4, A5] spotęgowały powysiłkowe zmiany profili DSC surowic (Fig. 2, 3, 4, 5 w [A4], Fig. 1 w [A5]). W obu sesjach po wysiłku zaobserwowano zmniejszenie pierwszego lokalnego maksimum, związanego głównie z frakcją albuminy wolnej od ligandów. Nieco większy spadek nadmiarowej pojemności cieplnej w tym zakresie temperatur wystąpił w przypadku wysiłku po serii 10 zabiegów sauny. Drugim efektem powysiłkowym, również intensywniejszym w sesji wysiłkowej po zabiegach w saunie, było zwiększenie intensywności i przesunięcie w kierunku wyższych temperatur trzeciego lokalnego maksimum, związanego głównie z frakcją gamma-globulin i albumin ze związanymi ligandami.

Średnie krzywe DSC surowicy z krwi pobranej przed ćwiczeniami i po wysiłku w sesjach bez zabiegów termicznych, po 10 zabiegach WBC i po 10 zabiegach w saunie porównano na Fig. 1 w [A5]. Wyraźny spadek intensywności krzywych DSC w zakresie temperatur 50–60°C i wzrost w zakresie 65–80 °C jest widoczne po wysiłku w stosunku do stanu wyjściowego. Efekt ten jest najsilniejszy podczas sesji ćwiczeń po zabiegach w saunie, co sugeruje, że zabiegi w saunie zwiększyły wysiłek związany z ćwiczeniami. Chociaż same zabiegi w saunie nie zmodyfikowały w istotny sposób przejścia denaturacyjnego surowicy, to w połączeniu z wysiłkiem dały silny efekt. Z kolei zabiegi WBC nieznacznie osłabiły zmiany w surowicy krwi, które obserwujemy na krzywych DSC. Fig. 2A i B [A5] pokazują, że średnie krzywe DSC surowicy po jednej godzinie i dobie regeneracji są podobne do krzywej wyjściowej, co oznacza, że zmiany spowodowane wysiłkiem stosunkowo szybko zanikają w sesjach mających miejsce po obydwu seriach zabiegów.

Także wyniki analizy statystycznej danych biochemicznych (Tab. 2 w [A5]) wykazały pewne istotne różnice w składzie proteomu związane z zabiegami: wyższy % albumin po 10 WBC w porównaniu z „bez zabiegów”, niższy % β -globulin i wyższy % γ -globulin po

zabiegach sauny w porównaniu z zabiegami WBC. Tak więc zmiany w proteomie surowicy krwi sportowca, warunkujące modyfikację profili DSC surowicy w sesji po zabiegach sauny, wydają się być silniejsze niż te w sesji nie poprzedzonej zabiegami. Uzyskane wyniki DSC wskazały stosunkowo dużą zmienność osobniczą w reakcji na zastosowane zabiegi, w szczególności na różnorodny proces regeneracji wśród sportowców, zwłaszcza po sesji ćwiczeń po saunie.

5. Wykaz artykułów stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej wraz z oświadczeniami współautorów

5.1. Michnik A, Sadowska-Krępa E, Domaszewski P, Duch K, Pokora I. Blood serum DSC analysis of well-trained men response to CrossFit training and green tea extract supplementation. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry (2017, 130, 1253–1262), doi 10.1007/s10973-017-6346-9

Impact Factor czasopisma: 2.209.

Liczba punktów ministerialnych: 25 pkt.

DOI: 10.1007/s10973-017-6346-9

Mój udział w załączonym artykule polegał na: wykonaniu części pomiarów DSC, czynnym udziale w analizie danych oraz zbieraniu danych literaturowych na etapie redakcji pracy.

Wkład pozostałych współautorów, w formie oświadczeń, zamieszczono na końcu artykułu.

Blood serum DSC analysis of well-trained men response to CrossFit training and green tea extract supplementation

Anna Michnik^{1,2}  · Ewa Sadowska-Krepa³ · Przemysław Domaszewski⁴ · Klaudia Duch^{1,2} · Ilona Pokora³

Received: 18 January 2017 / Accepted: 20 March 2017 / Published online: 4 April 2017
© The Author(s) 2017. This article is an open access publication

Abstract Differential scanning calorimetry (DSC) has been used for the detection of post-exercise changes in blood serum resulting from participation in the CrossFit (CF) training combined with green tea extract (GTE) supplementation. Blood samples from 20 well-trained men were collected at rest, immediately post-exercise and after 1 h of recovery in two trials: first before and second after CF training combined with GTE or placebo administration in the supplemented (S) and control (C) groups, respectively. Selected muscle damage biomarkers have been compared in different phases of the experiment. A significant increase in blood lactate content has been observed post-exercise in both trials in both participants' groups. The opposite trends have been noted for the C and S groups in creatine kinase (CK) activity changes recorded during the first to the second trial: an increase in CK for the control and a decrease for the supplemented group in all phases of the experiment: pre-exercise, post-exercise and after recovery. In the second trial, all CK values for the S group have been found significantly lower than the corresponding values recorded in the C group. These results suggest a

mitigate effect of GTE supplementation on post-training muscle damage. DSC results did not reveal clear effects of training nor GTE supplementation on serum denaturation transition. However, interesting dependences of thermodynamic parameters describing this transition have been observed in different phases of the experiment. Statistically significant negative correlations have been found between post-training $\text{VO}_{2\text{max}}$ and post-exercise thermodynamic parameters associated with haptoglobin contribution to serum denaturation transition.

Keywords CrossFit training · DSC · Exercise · Green tea extract · Human blood serum

Introduction

The consumption of exogenous supplemental antioxidants among athletes has increased despite the lack of clear evidence of their benefits. The majority of published papers confirm the general belief that antioxidant supplements improve health and even prevent several diseases. However, there is also a growing evidence regarding the useless or negative effects of antioxidant supplementation on physiological and biochemical outcomes and performance of exercise-trained individuals [1–4].

After many years of intensive research, it is now well documented that exhaustive exercise induces production of reactive oxygen species (ROS) resulting in increased oxidative stress, which may lead to the damage of cellular components, including proteins, lipids, carbohydrates and nucleic acids. So, a great body of researchers have investigated the possibility to prevent the exercise-induced oxidative stress and muscle damage through nutritional

✉ Anna Michnik
anna.michnik@us.edu.pl

¹ Department of Medical Physics, A. Chelkowski Institute of Physics, University of Silesia, ul. Uniwersytecka 4, 40-007 Katowice, Poland

² The Silesian Centre for Education and Interdisciplinary Research, ul. 75 Pułku Piechoty 1A, 41-500 Chorzów, Poland

³ Department of Physiological and Medical Sciences, The Jerzy Kukuczka Academy of Physical Education in Katowice, ul. Mikolowska 72a, 40-065 Katowice, Poland

⁴ Division of Tourism and Recreation, Faculty of Physical Education and Physiotherapy, Opole University of Technology, Opole, Poland

intervention, mainly using antioxidants. For a comprehensive review and discussion on this topic, please refer, e.g., to [4–6]. On the other hand, recent investigations report also several positive aspects of ROS generation in sport performance and their role in cell signaling and adaptation to regular training [7–9]. ROS play an important role in lipid peroxidation which leads to an increase in permeability of cell skeletal membranes, followed by a release of cytosolic proteins and enzymes such as creatine kinase (CK) and lactate dehydrogenase (LDH) into the blood [10]. Moreover, if oxidative stress levels are already low, which may be the case in healthy young individuals and athletes, the exogenous antioxidant supplementation may be detrimental. Thus, the relationship between exercise, oxidative stress and supplementation remains a complex issue.

Tea is a rich natural source of flavonoid antioxidants from the polyphenol family. Particularly, green tea extracts with antioxidant, anti-carcinogen, anti-inflammatory and anti-radiation properties have been a focus of recent scientific research. Beneficial effects of green tea or its extracts against cancer, obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease have been reported [11–13]. Antioxidant properties of green tea are associated with the presence of several polyphenols, primarily catechins including epigallocatechin gallate (EGCG), (–) epicatechin gallate (ECG), (–) epicatechin (EC) and (–) epigallocatechin (EGC) [14]. Zhang et al. [15] have recently shown that long-term supplementation with green tea polyphenol could provide an efficient protection against the health issues induced by high-voltage power lines. They found that 12 months of green tea polyphenol supplementation (GTPS) significantly diminished the negative effects of extremely low-frequency electromagnetic fields (ELF-EMFs) on the health of the exposed workers. However, 3 months after GTPS withdrawal, no protective effects of previous supplementation on oxidative stress and oxidative damage to DNA were observed.

Studies examining the effects of green tea consumption on exercise-induced oxidative stress and exercise metabolism in humans are rather scarce and results of these studies are often inconclusive [16, 20]. Previous studies have generally found that antioxidant supplements do not improve performance; however, there are many reports that exogenous antioxidant supplements may strengthen antioxidant defense system in healthy exercising humans and limit or even prevent the exercise-induced tissue damage or help the sportsmen to recover from the damage [21–23]. Richards et al. [17] have reported an increase in sport performance after green tea catechins (GTC) ingestion, namely a short-term ingestion of EGCG caused $\dot{V}O_{2\max}$ increase in 14 out of 19 subjects. Jówko et al. [18] have reported that a long-term (4-week) green tea extract (GTE) supplementation enhanced plasma total polyphenols at rest

as well as 5 min after the muscular endurance test and it contributed to the rise of resting total antioxidant status in plasma of previously untrained men. They concluded that dietary supplementation with GTE may provide protection against oxidative damage induced by both short-term muscular endurance test and long-term strength training. In another Jówko et al.'s study [19], green tea catechins-treated soccer players were able to perform a higher number of lift repetitions during the muscle endurance test, but none of the analyzed plasma biomarkers was affected by the ingestion of green tea catechins, suggesting that a 640 mg dose was too low to attenuate exercise-induced oxidative stress and muscle damage. Hodgson et al. [24] found that in healthy physically active men, GTE enhanced lipolysis and fat oxidation when compared to placebo, but only under resting conditions, whereas no effect of GTE was seen during exercise. In a more recent study, Sugita et al. [20] have investigated the effects of green tea catechins on oxidative stress metabolites in healthy individuals both at rest and during exercise. The overall data presented in this study suggested that GTC (a single dose of 780 mg) could improve physical performance particularly in terms of endurance capacity expressed as $\dot{V}O_{2\max}$ in a physically active general population.

Differential scanning calorimetry (DSC) has recently been found useful in the support of various medical diagnoses [25–36] by analysis of plasma or serum heat capacity changes in the temperature range of protein components thermal denaturation. DSC profiles of biofluids are able to reflect their modified composition, changes in thermal stability of major proteome components resulting from covalent modifications or binding interactions involving disease biomarkers. Generally, DSC profile of serum/plasma heat capacity changes provides information on the health status of blood donor based on the individual thermal characteristics. Thus, it seems justified to use the calorimetric analyses also for the evaluation of the beneficial or detrimental effects of physical activity or supplementation. Such innovative attempts of DSC adoption for the resolving of some problems in sport medicine were made by us recently [37, 38].

The purpose of the current study was to evaluate the effects of green tea extract supplementation in combination with CrossFit training lasting for 6 weeks on the physical performance and recovery after a short-term exercise in well-trained men. In addition to the typical evaluation of blood biomarkers of muscle damage, such as the activity of lactate dehydrogenase (LDH) and creatine kinase (CK), nonconventional approach has been applied. Using DSC method, blood serum samples taken from the participants during two trials: before and after a 6-week CrossFit training before, immediately after and 1 h after the exercise test have been analyzed.

Experimental

Participants of the experiment

Twenty nonsmoking male students of the Opole University of Technology, volunteers involved in CrossFit training (CF training), were randomized between the following groups: the control group-receiving placebo (C) and the group supplemented with the green tea extract (S). All subjects were informed about the purpose and the nature of the research before giving their written consent to participate in the experiment, which had been approved by the Ethics Committee of the Jerzy Kukuczka Academy of Physical Education in Katowice (No. 4/2013). The exclusion criteria were the use of tobacco products, alcohol consumption, the use of any medicine or dietary supplements during 4 weeks prior to the study.

Experiment design

All supplements were administrated in soft gelatinous capsules (Olimp Labs, Debica, Poland) at a dose of two capsules once a day for 6 weeks. One placebo capsule contained microcrystalline cellulose, magnesium stearate and maltodextrin instead of plant extract. One GTE capsule contained 250 mg of standardized GTE (245 polyphenols including 200 mg catechins among 137 mg epigallocatechin-3-gallate) and additional substances such as maltodextrin, microcrystalline cellulose and magnesium stearate. The daily doses of GTE extract were treated according to the manufacturer's instructions. In case of adverse events associated with dietary supplements, all subjects could opt out of taking part in this study.

All students participated an incremental maximal oxygen uptake ($\text{VO}_{2\text{max}}$) test on cycle ergometer (Sport Excalibur) at two occasions, i.e., before the CF training and supplementation (first trial) and then once more after 6 weeks of CF training and supplementation (second trial). After a short warm-up cycling, the subjects cycled in 3-min phases starting at a power output of 40 W, and increasing progressively by 40 W. The exercise was continued until exhaustion.

Blood serum samples

Blood samples were drawn from antecubital vein either into test tubes anticoagulated with heparin or containing clot activator for collection, respectively, of plasma or serum samples at rest, 3 min after exercise and after 1 h of passive recovery. Fresh plasma samples were assayed for activities of creatine kinase (CK), lactate dehydrogenase (LDH) and concentrations of lactate (LA) using diagnostic kits from Randox Laboratories (CK522, LD3818 and LC2389, respectively).

Serum samples were stored at -20°C before analysis. For DSC experiment, serum samples were diluted 20-fold with distilled degassed water. The pH value of the diluted samples has been within the range 6.5–7.0.

DSC experiment

DSC measurements were taken on the VP DSC MicroCal instrument (Northampton, MA) in the temperature range 20 – 100°C with the heating rate $1^{\circ}\text{C min}^{-1}$. A constant pressure of about 1.8 atm was exerted on the liquids in the cells. The calorimetric data were corrected for the instrumental baseline water–water. DSC curves were normalized for the gram mass of protein and next a linear baseline was subtracted. An apparent excess specific heat capacity Cp^{ex} ($\text{J }^{\circ}\text{C}^{-1} \text{g}^{-1}$) versus temperature ($^{\circ}\text{C}$) has been plotted.

The following parameters of observed DSC transitions have been determined: temperatures of local peak maxima T_m ($m = 1, 2, 3$), excess specific heat capacities at these temperatures Cp_m , the enthalpy (ΔH) of serum denaturation (calculated as the area under the endothermic peak, expressed in J g^{-1}) and the width of peak in its half height (HHW). All other experimental conditions and DSC data analysis were practically the same as during the earlier DSC study of human blood serum and described in [37].

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the Statistica 12 software. For all measures, descriptive statistics were calculated. Analysis of variance (ANOVA) with the stage of experiment as a repeated measure and the group as categorical variable was used. Mauchly's test for sphericity was included as a part of the procedure. If repeated measures ANOVA was statistically significant, Tukey's post hoc test was applied. Student's *t* test was used to compare the mean values between the two independent groups. The accepted level of significance was taken as $p < 0.05$.

When the results of Shapiro–Wilk test revealed that the distributions of the studied variables differed from normal data or in the case of nonhomogenous variances of analyzed groups (in Leven's test $p < 0.05$), appropriate non-parametric tests were used for comparative analyses.

Pearson's correlation coefficients were found to describe the relationships between biochemical and thermodynamic blood serum parameters.

Results and discussion

In Table 1, basic characteristics of two groups of participants of the study are given. No significant differences were found between the C and S groups in regard to age,

Table 1 Characteristics of participants

	C group (<i>n</i> = 9)	S group (<i>n</i> = 11)
Age/years	24.1 ± 2.7	22.5 ± 2.6
Height/cm	179.7 ± 7.8	181.1 ± 5.3
Body mass before CF training/kg	79.7 ± 10.8	79.9 ± 7.0
Body mass after CF training/kg	79.4 ± 10.6	80.0 ± 7.0
VO _{2max} before CF training/mL min ⁻¹ kg ⁻¹	45.7 ± 5.0	46.5 ± 5.2
VO _{2max} after CF training/mL min ⁻¹ kg ⁻¹	47.6 ± 4.1	48.2 ± 4.3
d VO _{2max} */mL min ⁻¹ kg ⁻¹	1.9 ± 2.7	1.7 ± 4.6

Values are means ± sd

* The mean value of differences between VO_{2max} after and before CF training

height and body mass, as well as in VO_{2max} values before the training. The placebo group has demonstrated something greater improvements in respiratory function with training (dVO_{2max} = 1.9 ± 2.7) compared with GTE-supplemented group (dVO_{2max} = 1.7 ± 4.6), but the difference was within the experimental error.

Blood biomarkers presented in Table 2 indicate that before the CF training, the mean values of LA concentration and CK activity were similar in both groups, while the level of LDH activity was significantly higher ($p = 0.01$ in Student's *t* test) in the group assigned to supplementation. It is probably a random difference and its reason is unknown especially that both the resting and post-exercise activities of LDH were within the references ranges, i.e., 230–460 U L⁻¹. After the training LDH activity remained unchanged in GTE-supplemented group and slightly increased in placebo group. LA level significantly increased after the exercise in both trials for both groups. The highest CK activity occurred for the C group after the exercise performed in the second trial. Differences between this CK value and all values (pre-exercise, post-exercise and after the recovery) in the first trial for the C group have been found statistically significant. Generally, a slightly higher post-exercise CK values were observed compared to other phases of the experiment (see Table 2). However, big standard deviations due to high individual variability diminish the perceived tendency. It seems important that the opposite trends have appeared for the placebo and GTE-supplemented groups in all CK activity changes from the first to the second trial: an increase for the first and a decrease for the second of said groups. Statistical analysis has revealed significant differences between C and S groups in post-training CK activities for all stages of experiment ($p = 0.03$, $p = 0.008$ and $p = 0.02$ for pre-exercise, post-exercise and after the recovery differences, respectively). For GTE-supplemented group, post-exercise CK activity before the training has been found significantly

higher than post-training pre-exercise and after 1 h of rest values. These results suggest that supplementation of tea polyphenols, at doses recommended according to manufacturer's instructions, may diminish post-training skeletal muscle damage through suppressive action on oxidative stress and inflammation [21].

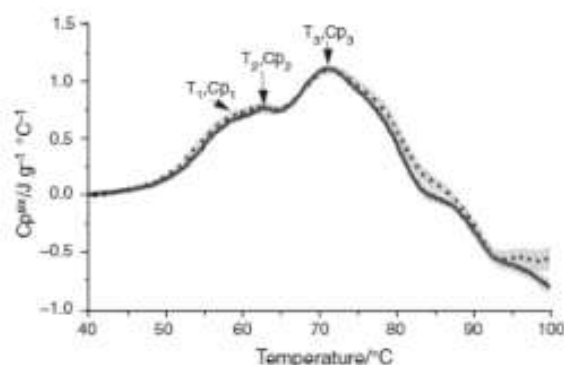
Averaged serum DSC curves for C and S groups of men are shown in Fig. 1. Both curves are very similar and differences between them are within the experimental error, besides the temperature range above 80 °C. The complex endothermic transition observed for serum solution represents the denaturation of serum proteins, which proceeds over the approximate temperature range 40–90 °C. Most commonly three local maxima can be noticed at T_1 , T_2 and T_3 . However, sometimes, T_1 or T_2 is absent. For this reason, the first maximum and the second maximum are not well visible in the averaged curves presented in Fig. 1. A contribution connected with protein aggregation is noticeable, particularly in the higher temperature range. The thermal profiles of heat capacity changes for aqueous solutions of human blood serum from athletes have been described and discussed in details earlier [37]. Comparing DSC curves of athletes serum diluted with distilled water (pH 6.5–7.0) with curves reported for serum/plasma of healthy persons where the final pH of solutions was in the range 7.2–7.5 [25–27, 29–36], distinct differences are visible. The main origin of these differences is probably the thermal denaturation profile of fatty acid-free fraction of albumin. DSC transition representing unfolding of this protein was shown much sharper in buffer (pH 7.2) than in water (pH 6.5) solution (see Fig. 1a in [39]).

The averaged effects of CF training in the C group and training plus supplementation in the S group on DSC serum profiles in pre-exercise stages are presented in Fig. 2a, b, respectively. In both cases, the differences between DSC curves corresponding to serum before and after the training are very small, and the bigger one seems to be that for the

Table 2 Changes in LA concentration, CK and LDH activities induced by the CF training with concomitant supplementation with placebo ($n = 9$) or GTE ($n = 11$)

		C group		S group	
		First trial	Second trial	First trial	Second trial
LA/mmol L ⁻¹	be	1.38 ± 0.52	1.13 ± 0.46	1.47 ± 0.52	1.30 ± 0.50
	ae	10.72 ± 2.87	10.07 ± 2.92	9.06 ± 1.63	9.40 ± 2.57
CK/U L ⁻¹	be	214 ± 49	260 ± 88	206 ± 48	188 ± 43
	ae	233 ± 54	286 ± 89	242 ± 46	199 ± 37
	rlh	218 ± 46	241 ± 54	214 ± 41	190 ± 39
LDH/U L ⁻¹	be	242 ± 42	291 ± 37	306 ± 54	305 ± 29
	ae	291 ± 40	309 ± 50	362 ± 61	335 ± 18
	rlh	262 ± 41	295 ± 44	311 ± 46	312 ± 36

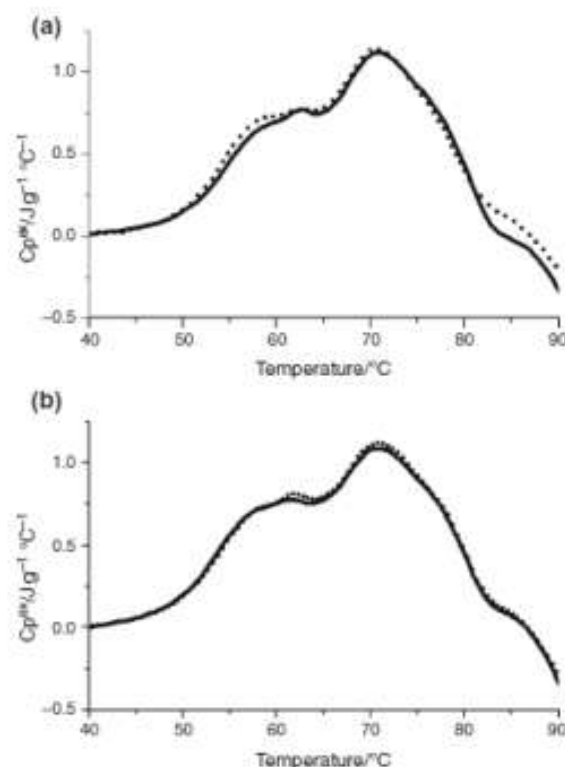
Values are means ± s.d., be before the exercise, ae 3 min after the exercise, rlh after 1 h of passive recovery

**Fig. 1** Mean serum DSC curves for participants from C (solid lines) ($n = 9$) and S (dotted lines) ($n = 11$) groups; the shadow represents standard errors

control placebo group C. These small averaged post-training changes appear in the region of T_1 for the C group and around T_2 for the S group.

Although mean DSC curves have been practically unchanged through the CF training and GTE supplementation, in individual cases, significant differences in heat capacity thermal profile of participants serum could be observed. Examples of such meaningful differences are shown in Fig. 3a, b for selected participants from C and S groups, respectively. A decrease in Cp_2 (the heat capacity corresponding to local maximum at T_2) intensity is well visible in Fig. 3a for the representative from placebo group and a substantial changes in the temperature range 55–65 °C in Fig. 3b, which have appeared after the training combined with supplementation.

To illustrate and to evaluate the effect of a graded exercise to volitional fatigue and next the 1 h of rest, sets of three curves are shown in Fig. 4 for the C group before the training and in Fig. 5 for the S groups after the training

**Fig. 2** a Comparison of mean serum DSC curves in pre-exercise stage before (solid lines) and after (dotted lines) the CrossFit training for the C group. b Comparison of mean serum DSC curves in pre-exercise stage before (solid lines) and after (dotted lines) the CrossFit training for the S group

and GTE supplementation. The comparison of these average curves indicates that the exercise performed by men slightly shifts the observed endothermic transition to lower temperatures. The effect visible in Fig. 4 has been

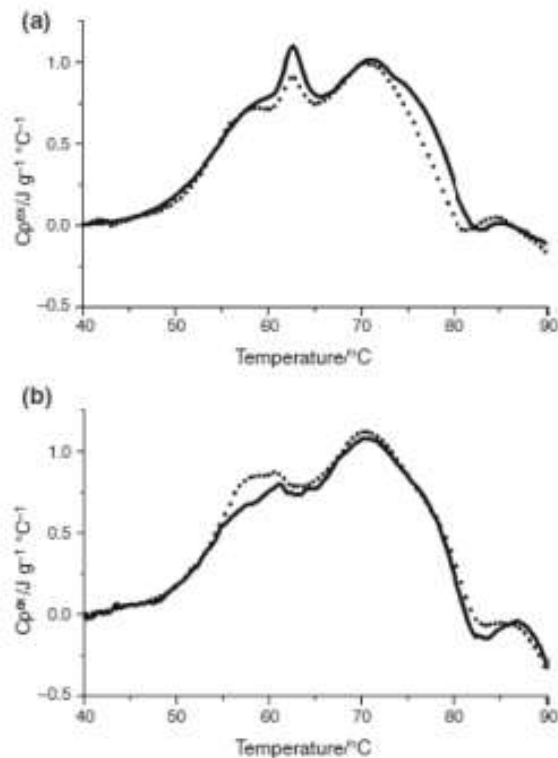


Fig. 3 **a** An example of substantial differences between serum DSC curves before (solid lines) and after (dotted lines) CF training for the representative from the C group. **b** An example of substantial differences between serum DSC curves before (solid lines) and after (dotted lines) CF training in combination with GTE supplementation

observed even weaker in the case of S group (not shown) and after the training in both groups. After the recovery period of 1 h changes recede, but for the S group in the second trial mean DSC curve for serum acquired after the rest does not practically differ from that corresponding to

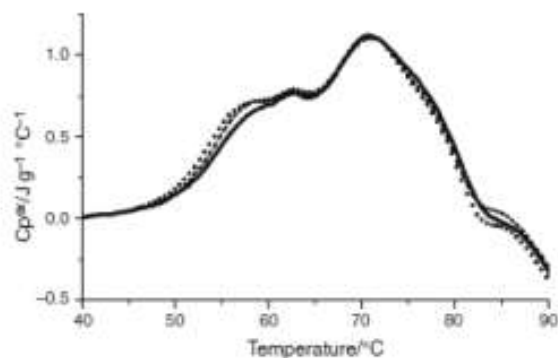


Fig. 4 Comparison of mean serum DSC curves in three stages: pre-exercise (solid lines), post-exercise (dotted lines) and after 1 h of rest (dashed dotted lines) before the CrossFit training for the C group

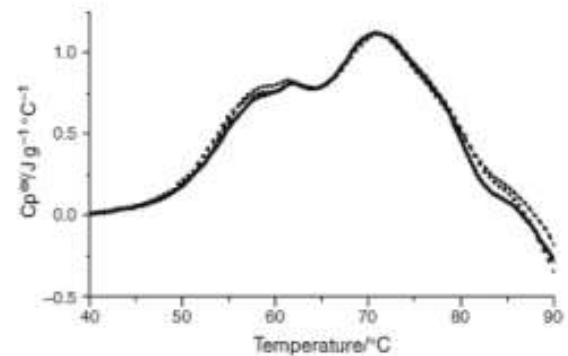


Fig. 5 Comparison of mean serum DSC curves in three stages: pre-exercise (solid lines), post-exercise (dotted lines) and after 1 h of rest (dashed dotted lines) after the CrossFit training for the S group

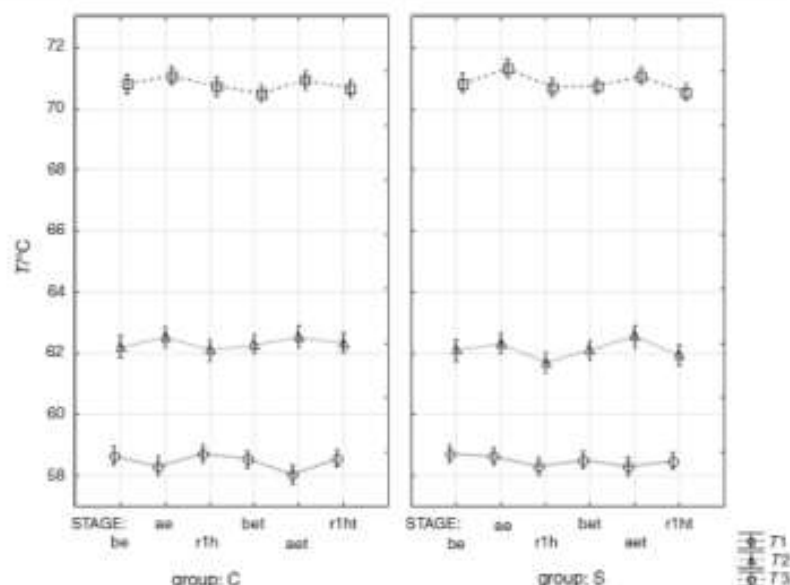
post-exercise serum (Fig. 5). It is worth mentioning that the response to exercise and rest varied substantially among individual participants of the study.

Modifications of serum DSC transition observed in current study due to the exercise and rest for well-trained participants are very small in contrast to relatively distinct changes found in our previous study for amateur cyclists [37]. The main reason for this poor response of serum proteins on strenuous exercise is probably a high physical performance of participants even before the training. CrossFit is extremely popular form of multimodal exercise training conducted at high intensity in order to improve endurance, strength and flexibility [40]. Data from available studies suggest that catechins can improve physical performance particularly in terms of endurance capacity and $\text{VO}_{2\text{max}}$ in untrained subjects, but the same results cannot be reached in physically active people and well-trained athletes [5].

The mean values $\pm$ SEM of parameters describing the endothermic denaturation transition for serum acquired from participants in the first (before the CrossFit training) and in the second (after the training, marked with additional letter t) trial for C (control—placebo) and S (GTE supplemented) groups are presented in Figs. 6–9. The dependence of these parameters on the stage of experiment: before exercise (be), after exercise (ae) and after 1 h of rest (r1h), is illustrated.

Figure 6 suggests that the character of T_1 , T_2 and T_3 dependences on the stage of experiment is very similar irrespective of the group and a completion of the training. No significant differences in T_m values have been observed between both groups in the adequate study periods. For both groups in both trials, post-exercise T_1 was somewhat lower, while post-exercise T_2 and T_3 were higher than before the exercise. Taking together results for both groups in both trials, the repeated measure ANOVA indicated

Fig. 6 Mean values of T_1 , T_2 and T_3 ($\pm$ s.e.) for different stages of experiment in both groups



statistically significant differences between T_2 ($p = 0.00005$) as well as between T_3 ($p = 0.00004$) in different stages of experiment. According to post hoc Tukey's test, post-exercise values of T_2 and T_3 were significantly higher than after 1 h of rest. Considering additionally the factor "group," mentioned differences for T_2 were significant only in GTE-supplemented group. Moreover, post-exercise values of T_3 in both trials were significantly higher than before-exercise value in the second trial. Only for the S group post-exercise T_3 value in the first trial was significantly higher than values of T_3 obtained in both trials after the rest.

Changes in Cp_1 , Cp_2 and Cp_3 related to the stage of experiment, shown in Fig. 7, seem somewhat different for the C and S groups. However, suggested by Fig. 7 differences between both groups in Cp_m mean values are not statistically significant. Interesting results have been found for Cp_2 parameter. For the S group, after the training and supplementation Cp_2 value is maintained at a constant, higher than in the first trial, level. Generally, taking the stage of experiment as a main factor, according to the repeated measure ANOVA, differences between mean Cp_2 values are statistically significant ($p = 0.047$). Taking into consideration the data obtained for both groups, the pre-exercise Cp_2 in the first trial has been found significantly lower than post-exercise value after the training ($p = 0.02$ in post hoc Tukey's test).

The main origin of the local maximum (T_2 , Cp_2) in the serum denaturation peak is probably haptoglobin, the protein from alpha-2 globulins fraction [25, 37]. Haptoglobin is an acute-phase protein, the synthesis of which is

increased during inflammation. Haptoglobin binds free hemoglobin released from erythrocytes with high affinity and therefore inhibits its oxidative activity. In this study, significant negative correlations have been found between VO_{2max} after CF training and post-exercise T_2 ($r = -0.52$; $p = 0.03$) as well as post-exercise Cp_2 ($r = -0.68$; $p = 0.03$) after the training. The first of said correlations was even higher in the control group ($r = -0.78$), while the second in the supplemented group ($r = -0.86$). Thus, higher VO_{2max} after the CF training implies a smaller increase in T_2 and Cp_2 after the exercise.

The relationship between VO_{2max} and Cp_2 intensity confirms the observation that a lack of T_2 local maximum has been most frequently accompanied by VO_{2max} higher than $50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$. Moreover, the case shown in Fig. 3a represents a man with the lowest value of VO_{2max} : 39 and 43 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ before and after the CF training, respectively. Among all DSC curves recorded in the current study, it was the case with the highest Cp_2 component. In accordance with the found negative correlation between VO_{2max} and Cp_2 , a decrease in Cp_2 component has been observed due to the increase in VO_{2max} after the training.

Figures 8 and 9 indicate that trends of changes in the enthalpy of serum denaturation (ΔH) and HHW are very similar in both groups, but these values are bigger for the S group. An increase in ΔH and HHW after the exercise and a decrease after the recovery period have been observed in the first as well as in second trial for both groups. Statistically significant differences have been found only for HHW parameter due to "group" and "stage" factors

Fig. 7 Mean values of Cp_1 , Cp_2 and Cp_3 ($\pm$ s.e.) for different stages of experiment in both groups

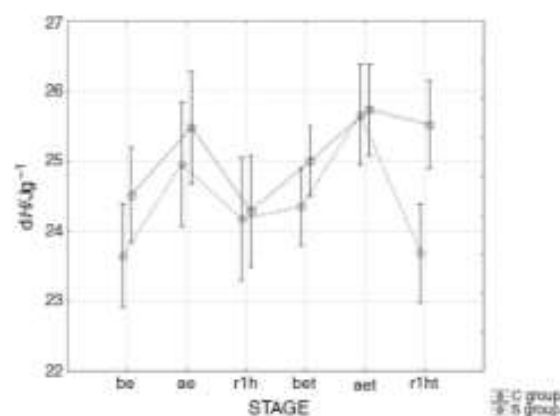
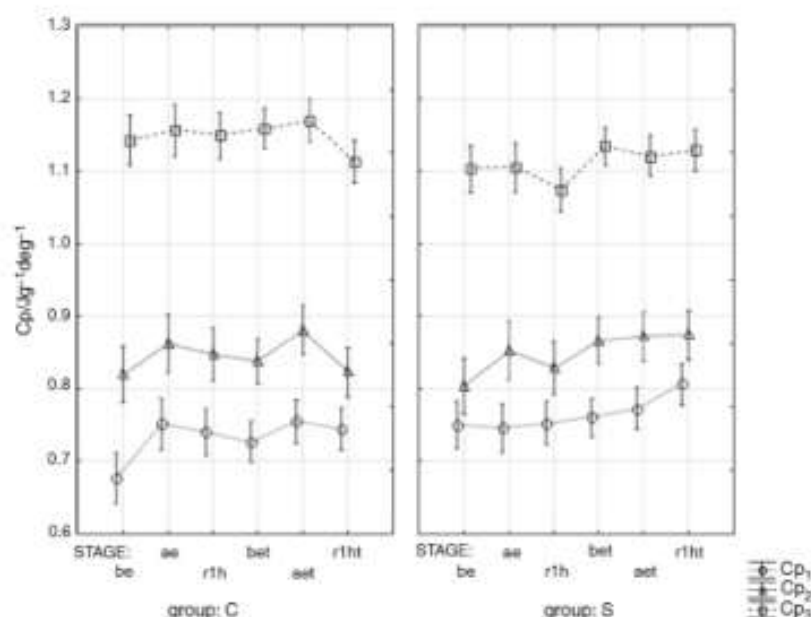


Fig. 8 Mean values of ΔH ($\pm$ s.e.) for different stages of experiment in both groups

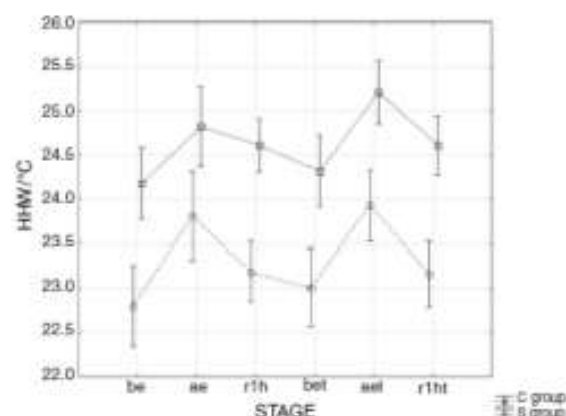


Fig. 9 Mean values of HHW ($\pm$ s.e.) for different stages of experiment in both groups

($p = 0.004$ and $p = 0.01$, respectively). Additionally, post hoc Tukey's test has revealed significantly broader serum denaturation transition in the post-exercise stage in the second trial for the S group than in all stages for the C group except these after the exercise.

An explanation of why obtained HHW values are higher for the S than for the C group and after the exercise is not simple, and we are not able to clarify this problem at present. Generally, smaller HHW indicates greater cooperativity of the observed thermal transition, but exothermic proteins aggregation following their endothermic unfolding may also cause a narrowing of the denaturation transition. Another reason of differences in the width of peak

represented serum denaturation may be the proportion of constituent proteins or modification of their structures, for example, due to oxidation. Slightly higher values of Cp_3 for the C than for the S group (except the after recovery stage in the second trial) suggest a higher contribution from gamma globulins in the control group. However, more prominent cause of considered broadening of serum transition seems to be connected with its low temperature range (see Figs. 1, 4), where the main contribution comes from albumin, the most abundant human serum protein. An increase in albumin level after the exercise was found in our earlier study [37]. Additionally, conformational changes in albumin molecule due to the binding of fatty acids or

other ligands as well as protein glycation affect its folding and stability [41, 42]. This heterogeneity of the albumin molecule may cause the extension of thermal unfolding range. Albumin plays, among others, key antioxidant functions. In normal conditions, oxidation of albumin involves only a minor part of the protein. However, due to oxidative stress more oxidants react with albumin and give rise to oxidized albumin level. Reported by Musante et al. [43], value of ΔH for oxidized albumin was bigger and thermal melting peak was shifted significantly to the higher temperature range (T_m above 80 °C was observed) in comparison with normal albumin. The oxidative stress caused by strenuous physical exercise may lead to the increased fraction of oxidized albumin in serum [44]. This may be one of the reasons for broadening the temperature range of serum denaturation because of the additional contribution from this form of albumin also to the higher temperature side of serum endothermic transition.

Conclusions

It is now generally accepted that strenuous physical exercise can induce oxidative stress in humans. Antioxidants supplementation may support endogenous defense system and prevent or reduce oxidative stress, decrease muscle damage and improve exercise performance. The results of the present study support this view to a certain extent. According to the obtained data, GTE supplementation parallel with a strenuous CF training prevents the post-training increase in creatine kinase (CK) activity observed for the placebo group. Thus, GTE can mitigate the muscle damage induced by physical exercise.

DSC results do not indicate the clear effects of training or GTE supplementation on serum denaturation transition. However, thermodynamic parameters of this thermal transition change in a characteristic way during the performed experiment. While comparing these parameters for the C and S groups in two trials: before and after the CF training and in three phases: pre-exercise, post-exercise and after 1 h of resting recovery, some significant differences have been found. In particular, in both trials, taken together for both groups post-exercise values of T_2 as well as T_3 have appeared significantly higher than corresponding values after the recovery. The post-exercise values of T_3 in both trials have also been stated as significantly higher than before-exercise T_3 value in the second trial. No significant differences in T_m values have been observed between both groups in corresponding study periods. Taking into account the data obtained for both groups, the pre-exercise Cp_2 before the training has been shown significantly lower than post-exercise Cp_2 after the training. Comparing the width of the serum denaturation transition, it has been higher for

the S than for the C group in all stages of the experiment. The broadest transition (the highest mean HHW value) has been observed after the exercise in the second trial for the S group. It is not clear why the exercise in conjunction with CF training and GTE supplementation leads to a reduction in the transition cooperativity.

A summary of the biochemical and calorimetric data has revealed the relationship between VO_{2max} and Cp_2 intensity. The findings of statistical analysis indicate significant negative correlation between these variables. The overall data presented in this study suggest that in terms of VO_{2max} catechins do not improve physical performance in physically active, well-trained men. However, further studies are needed to clarify this problem.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

References

- Petemelj TT, Coombes JS. Antioxidant supplementation during exercise training: beneficial or detrimental? *Sports Med.* 2011;41:1043–69.
- Gomez-Cabren MC, Ristov M, Vuja J. Antioxidant supplements in exercise: worse than useless? *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012;302:E476–7.
- Brisswalter J, Louis J. Vitamin supplementation benefits in master athletes. *Sports Med.* 2014;44(3):311–8.
- Pingitore A, Lima GPP, Mastorci F, Quinones A, Iervasi G, Vassalle C. Exercise and oxidative stress: potential effects of antioxidant dietary strategies in sports. *Nutrition.* 2015;31:916–22.
- Malaguti M, Angeloni C, Hrefia S. Polyphenols in exercise performance and prevention of exercise-induced muscle damage. *Oxid Med Cell Longev.* Hindawi Publishing Corporation. 2013. Article ID 825928. doi: 10.1155/2013/825928.
- Myburgh KH. Polyphenol supplementation: benefits for exercise performance or oxidative stress? *Sports Med.* 2014;44(Suppl 1):S57–70.
- Yavari A, Javadi M, Mirmiran P, Bahadoran Z. Exercise-induced oxidative stress and dietary antioxidants. *Asian J Sports Med.* 2015;6(1):1–7.
- Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S, et al. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *Biomed Res Int* 2014;2014, Article ID 761264. doi:10.1155/2014/761264.
- Steinhilber P, Eickl P. Impact of oxidative stress on exercising skeletal muscle. *Biomolecules.* 2015;5:356–77.
- Banfi G, Colombini A, Lombardi G, Lubkowska A. Metabolic markers in sports medicine. *Adv Clin Chem.* 2012;56(1):24.
- Yang CS, Landau JM. Effects of tea consumption on nutrition and health. *J Nutr.* 2000;130:2409–12.
- Sae-Tan S, Grove KA, Lambert JD. Weight control and prevention of metabolic syndrome by green tea. *Pharmacol Res.* 2011;64(2):146–54.

13. Park HJ, DiNatale DA, Chung MY, Park YK, Lee JY, Koo SI, O'Connor M, Manautou JE, Bruno RS. Green tea extract attenuates hepatic steatosis by decreasing adipose lipogenesis and enhancing hepatic antioxidant defenses in ob/ob mice. *J Nutr Biochem*. 2011;22(4):393–400.
14. Singh BN, Shankar S, Srivastava RK. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications. *Biochem Pharmacol*. 2011;82(12):1807–21.
15. Zhang Y, Zhang D, Zhu B, Zhang H, Sun Y, Sun C. Effects of dietary green tea polyphenol supplementation on the health of workers exposed to high-voltage power lines. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2016;46:183–7.
16. Panza VS, Wazlawik E, RicardoSchütz G, Comin L, Hecht KC, da Silva EL. Consumption of green tea favorably affects oxidative stress markers in weight-trained men. *Nutrition*. 2008;24(5):433–42.
17. Richards JC, Lonac MC, Johnson TK, Schweder MM, Bell C. Epigallocatechin-3-gallate increases maximal oxygen uptake in adult humans. *Med Sci Sports Exerc*. 2010;42(4):739–44.
18. Jówko E, Sacharuk J, Balasinska B, et al. Green tea extract supplementation gives protection against exercise-induced oxidative damage in healthy men. *Nutr Res*. 2011;31(1):813–21.
19. Jówko E, Sacharuk J, Balasinska B, et al. Effect of a single dose of green tea polyphenols on the blood markers of exercise-induced oxidative stress in soccer players. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*. 2012;22(6):486–96.
20. Sugita M, Kapoor MP, Nishimura A, Okubo T. Influence of green tea catechins on oxidative stress metabolites at rest and during exercise in healthy humans. *Nutrition*. 2016;32:321–31.
21. Hefflinger KA, Chirumaza DM, Ceddia MA. Supplementation with a polyphenolic blend improves post-exercise strength recovery and muscle soreness. *Food Nutr Res*. 2015;59:1–10.
22. Zapora E, Holub M, Waszkiewicz E, Dąbrowska M, Skrzydlewska E. Green tea effect on antioxidant status of erythrocytes and on haematological parameters in rats. *Bull Vet Inst Pulawy*. 2009;53(1):139–45.
23. Arent SM, Senso M, Golem DL, McKeever KH. The effects of the flavin-enriched black tea extract on muscle soreness, oxidative stress, inflammation, and endocrine responses to acute anaerobic interval training: a randomized, double-blind, cross-over study. *J Int Soc Sports Nutr*. 2010;7(1):11.
24. Hodgson AB, Randell RK, Boon N, et al. Metabolic response to green tea extract during rest and moderate-intensity exercise. *J Nutr Biochem*. 2013;24(1):325–34.
25. Garbett NC, Miller JJ, Jensen AB, Chaires JB. Calorimetry outside the box: a new window into the plasma proteome. *Biophys J*. 2008;94:1377–83.
26. Garbett NC, Mekmaysy CS, Helm W, Jensen AB, Chaires JB. Differential scanning calorimetry of blood plasma for clinical diagnosis and monitoring. *Exp Mol Pathol*. 2009;86:186–91.
27. Michnik A, Drzazga Z, Michalik K, Barczyk A, Santura I, Sorańska E, Pierzchała W. Differential scanning calorimetry study of blood serum in chronic obstructive pulmonary disease. *J Therm Anal Calorim*. 2010;102:57–60.
28. Lőrinczy D, editor. Thermal analysis in medical application. Budapest: Akadémiai Kiadó; 2011.
29. Todinova S, Krumova S, Gancheva L, Roberts Ch, Taneva SG. Microcalorimetry of blood serum proteome: a modified interaction network in the multiple myeloma case. *Anal Chem*. 2011;83:7992–8.
30. Todinova S, Krumova S, Kurtev P, Dimitrov V, Djongov L, Dadankov Z, Taneva SG. Calorimetry-based profiling of blood plasma from colorectal cancer patients. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1820:1879–85.
31. Fekets T, Zapf I, Ferencz A, Lőrinczy D. Differential scanning calorimetry (DSC) analysis of human plasma in melanoma patients with or without regional lymph node metastases. *J Therm Anal Calorim*. 2012;108:149–52.
32. Krumova S, Rukova B, Todinova S, Gancheva L, Milanova V, Toncheva D, Taneva SG. Calorimetric monitoring of the serum proteome in schizophrenia patients. *Thermochim Acta*. 2013;572:59–64.
33. Moezzi M, Fekets T, Zapf I, Ferencz A, Lőrinczy D. Differential scanning calorimetry (DSC) analysis of human plasma in different psoriasis stages. *J Therm Anal Calorim*. 2013;111:1801–4.
34. Garbett NC, Mekmaysy CS, DeLeeuw L, Chaires JB. Clinical application of plasma thermograms. Utility, practical approaches and considerations. *Methods*. 2015;76:41–50.
35. Vega S, Garcia-Gonzalez MA, Lanas A, Velazquez-Campoy A, Abian O. Deconvolution analysis for classifying gastric adenocarcinoma patients based on differential scanning calorimetry serum thermograms. *Sci Rep*. 2015;5:7988. doi:10.1038/srep07988.
36. Ferencz A, Lőrinczy D. DSC measurements of blood plasma on patients with chronic pancreatitis and operable and inoperable pancreatic adenocarcinoma. *J Therm Anal Calorim*. 2017;. doi:10.1007/s10973-016-5371-4.
37. Michnik A, Drzazga Z, Poprzęcki S, Czuba M, Kempa K, Sadowska-Krepa E. DSC serum profiles of sportsmen. *J Therm Anal Calorim*. 2013;113:365–70.
38. Michnik A, Drzazga Z, Sadowska-Krepa E, Kłapcińska B. Calorimetric monitoring of the effect of endurance training and testosterone treatment on rat serum denaturation transition. *J Therm Anal Calorim*. 2014;115:2231–7.
39. Michnik A, Drzazga Z. Thermal denaturation of mixtures of human serum proteins DSC study. *J Therm Anal Calorim*. 2010;101:513–8.
40. Glassman G. The CrossFit training guide. CrossFit J. 2010;9:1–115.
41. Michnik A, Michalik K, Kluczevska A, Drzazga Z. Comparative DSC study of human and bovine serum albumin. *J Therm Anal Calorim*. 2006;84:113–7.
42. Vetter SW, Indurthi VSK. Moderate glycation of serum albumin affects folding, stability, and ligand binding. *Cin Chim Acta*. 2011;412:2105–16.
43. Musante L, Bruschi M, Candiano G, Petretto A, Dimasi N, Del Boccio P, Urbani A, Rialdi G, Ghiggeri GM. Characterization of oxidation end product of plasma albumin 'in vivo'. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;349(2):668–73.
44. Inai H, Hayashi T, Negawa T, Nakamura K, Tomida M, Koda K, et al. Strenuous exercise-induced change in redox state of human serum albumin during intensive kendo training. *Jpn J Physiol*. 2002;52:135–40.

Anna Michnik

Chorzów, 01.06.2022

Instytut Fizyki, Uniwersytet Śląski

ul. 75 Pułku Piechoty 1a, 41-500 Chorzów

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Michnik A, Sadowska-Krępa E, Domaszewski P, Duch K, Pokora I, *Blood serum DSC analysis of well-trained men response to CrossFit training and green tea extract supplementation*, in: *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, vol. 130, Springer International Publishing, DOI 10.1007/s10973-017-6346-9, Print ISSN 1388-6150, Electronic ISSN 1588-2926), 2017, pp 1253–1262 mój udział polegał na: wykonaniu większości pomiarów DSC, analizie i opracowaniu danych, stworzeniu koncepcji, napisaniu i edycji manuskryptu.



Podpis

Ewa Sadowska-Krępa

Chorzów, 01.06.2022

Katedra Nauk Fizjologicznych i Medycznych

Akademia Wychowania Fizycznego im. J. Kukuczki

ul. Mikołowska 72a, 40-065 Katowice

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Michnik A, Sadowska-Krępa E, Domaszewski P, Duch K, Pokora I, *Blood serum DSC analysis of well-trained men response to CrossFit training and green tea extract supplementation*, in: *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, vol. 130, Springer International Publishing, DOI 10.1007/s10973-017-6346-9, Print ISSN 1388-6150, Electronic ISSN 1588-2926), 2017, pp 1253–1262 mój udział polegał na: stworzeniu koncepcji badań, ich organizacji, nadzorze nad prowadzonymi badaniami biochemicznymi, czynnym udziale w analizie wyników badań biochemicznych, czynnym udziale w pisaniu i edycji manuskryptu.


.....
Podpis

Przemysław Domaszewski

Chorzów, 01.06.2022

Wydział Nauk o Zdrowiu,

Uniwersytet Opolski

ul. Katowicka 68, 45-040 Opole

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Michnik A, Sadowska-Krepa E, Domaszewski P, Duch K, Pokora I, *Blood serum DSC analysis of well-trained men response to CrossFit training and green tea extract supplementation*, in: *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, vol. 130, Springer International Publishing, DOI 10.1007/s10973-017-6346-9, Print ISSN 1388-6150, Electronic ISSN 1588-2926), 2017, pp 1253–1262 mój udział polegał na: udziale w organizacji eksperymentu, wykonaniu części badań biochemicznych i zabezpieczeniu materiału biologicznego do badań kalorymetrycznych.



.....
Podpis

Ilona Pokora

Chorzów, 01.06.2022

Zakład Fizjologii, Katedra Nauk Fizjologicznych i Medycznych

Akademia Wychowania Fizycznego im. J. Kukuczki

ul. Mikołowska 72a, 40-065 Katowice

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Michnik A, Sadowska-Krępa E, Domaszewski P, Duch K, Pokora I, *Blood serum DSC analysis of well-trained men response to CrossFit training and green tea extract supplementation*, in: *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, vol. 130, Springer International Publishing, DOI 10.1007/s10973-017-6346-9, Print ISSN 1388-6150, Electronic ISSN 1588-2926), 2017, pp 1253–1262 mój udział polegał na: dyskusji wyników badań i treści zredagowanego manuskryptu.



Podpis

5.2. Duch K, Michnik A, Pokora I, Sadowska-Krępa E, Kielboń A. Whole-body cryostimulation impact on blood serum thermal denaturation profiles of cross-country skiers. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry (2019, 138, 4505–4511), doi 10.1007/s10973-019-08766-9

Impact Factor czasopisma: 4.626.

Liczba punktów ministerialnych MEiN: 100 pkt.

DOI: 10.1007/s10973-019-08766-9

Mój udział w załączonym artykule polegał na: wykonaniu większej części pomiarów DSC, opracowaniu, analizie i dyskusji wyników, czynnym udziale w pisaniu i edycji manuskryptu.

Wkład pozostałych współautorów, w formie oświadczeń, zamieszczono na końcu artykułu.



Whole-body cryostimulation impact on blood serum thermal denaturation profiles of cross-country skiers

Klaudia Duch¹ · Anna Michnik¹ · Ilona Pokora² · Ewa Sadowska-Krępa³ · Agnieszka Kielbaso¹

Received: 14 November 2018 / Accepted: 29 August 2019 / Published online: 9 September 2019
© The Author(s) 2019

Abstract

Blood plasma and serum are important diagnostic materials as they clearly reflect an individual's metabolism. The study has evaluated the effect of whole-body cryostimulation (WBC) on the blood serum of professional cross-country skiers. The experiment involved eight athletes (two women and six men) who underwent a series of ten WBC treatments. Aqueous solutions of human blood serum samples before WBC procedures, after one treatment and after a series of ten treatments were measured by means of differential scanning calorimetry (DSC), a relatively novel diagnostic tool. DSC results showed rather little impact of cryostimulation on heat capacity changes accompanying the process of thermal denaturation of blood serum proteins in elite athletes. However, the statistically significant reduction in the intensity of the serum denaturation transition in its low temperature range has been observed after ten WBC treatments. The results have been interpreted by changes in the serum proteome profile, notably in the ratio of ligated to unligated albumin molecules. As a side result, the relationships between the relative change in body fat mass after ten WBC treatments and the levels of alpha2-globulins and beta2-globulins fractions have been found.

Keywords Cross-country skiers · DSC · Human blood serum · Protein thermal denaturation · Whole-body cryostimulation

Introduction

Cross-country skiing belongs to the group of winter sports. The preparatory period in this group of sports is from spring to autumn [1]. An athlete who trains skiing engages most of his muscles. Skiers should not only have highly anaerobic, but also aerobic power and endurance, because the ski trails have a varied profile [1–4]. Therefore, it is

important to prepare a cross-country skier to continuous changes in the intensity of the effort.

National representatives, elite athletes are subjected to various activities supporting their preparatory process for the start-up season. Whole-body cryostimulation (WBC) is used very often in sports medicine in rehabilitation, treatment of injuries or biological regeneration due to its positive effect on the body of athletes [5–14]. It has been shown that WBC affects the level of cytokines [5, 6, 11], reduces athletic hemolysis [5, 7, 8], reduces pro-inflammatory responses [5, 8], supports muscle and whole-body regeneration [5, 8, 9, 11, 12], supports the reduction in oxidative stress [5, 10, 14], counteracts the negative effects of exercise overloads [5, 8, 12, 13], supports the treatment of sports injuries [5, 8, 12, 13], prepares the body for higher loads [12] and reduces pain [13]. There are also works in which there were no positive effects of using cryotherapy, and they should not be neglected [5]. Such works should be an incentive for cooperation and further research on the impact of cryostimulation on the human body.

For several years, many attempts have been made to apply the differential scanning calorimetry (DSC) method

Anna Michnik
anna.michnik@us.edu.pl

¹ Department of Medical Physics, A. Chelkowski Institute of Physics, The Silesian Centre for Education and Interdisciplinary Research, University of Silesia in Katowice, ul. 75 Pułku Piechoty 1A, 41-500 Chorzów, Poland

² Department of Physiological and Medical Sciences, Department of Physiology, The Jerzy Kukuczka Academy of Physical Education in Katowice, ul. Mikołowska 72a, 40-065 Katowice, Poland

³ Department of Physiological and Medical Sciences, Department of Biochemistry, The Jerzy Kukuczka Academy of Physical Education in Katowice, ul. Mikołowska 72a, 40-065 Katowice, Poland

in various areas of medical diagnostics and sports medicine, DSC profiles of biological fluids can be a source of valuable information about the health of patients as well as athletes [15–27]. The DSC method was used in patients with multiple disease entities [15–24]. The branch of research among athletes is just developing [25–27]. Further research is needed on various groups of athletes to effectively support sports training and help in the case of problems related to the health of athletes.

The aim of the conducted research was to assess the impact of cryostimulation treatments on the course of the process of thermal denaturation of proteins contained in blood sera of elite athletes, well trained in cross-country skiing.

Materials and methods

Participants

Eight athletes (two women and six men) well trained in cross-country skiing participated in this study. Athletes participating in our study belong to the national team and take part in competitions around the world. The study was performed during the transient phase of the annual training plan. A group of these athletes has undergone a series of ten cryostimulation treatments. Characteristics of the group of athletes before the treatments (mean $\pm$ SD) were age 22.8 ± 2.9 year, mass 73.7 ± 9.6 kg, height 176.7 ± 11.0 cm, BMI 23.6 ± 1.4 kg m⁻², skeletal muscle mass 36.8 ± 7.0 kg, fat mass 9.3 ± 2.9 kg, percentage of body fat $13.1 \pm 5.8\%$. After a series of ten cryostimulation treatments, athletes were again characterized and two of these parameters changed: fat mass to 8.2 ± 3.6 kg and percentage of body fat to $11.8 \pm 6.7\%$.

Blood samples were taken from athletes before the beginning of cryostimulation, after the first treatment and after a series of ten cryostimulation treatments. Blood collection, of which the sera for the calorimetric study were obtained, took place the next day after completing one or ten WBC treatments. All blood samples were taken in the morning. A number of biochemical tests were performed on samples from athletes, including electrophoresis and creatine kinase assay.

All athletes were informed about the purpose and the nature of the research before giving their written consent to participate in the experiment. The studies were performed in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional and national) and with Declaration of Helsinki. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Jerzy Kukuczka Academy of Physical Education in Katowice (Certificate of Approval No. 2/2016).

Whole-body cryostimulation

Cryostimulation (WBC) procedure was carried out in the cryo-chamber located in Upper Silesian Center of Medicine and Rehabilitation in Katowice. The treatment sessions were held in the afternoons, 5 days a week, from Monday to Friday for 2 weeks. The athletes entered the chamber in groups of five persons. Each cryostimulation session lasted 3 min (-130 °C). Entry to the cryo-chamber was preceded by a 30-s adaptation period in the vestibule at a temperature of -60 °C, from which the athletes went further to the proper chamber, where they moved slowly in a circle, one after the other, without mutual contact, no additional movement or talking. After a minute, a change in the direction of motion was recommended. Contact with the participants was maintained via a camera in the room and voice contact.

Preparation of serum samples

Blood serum samples were prepared using the standard method and kept frozen at -20 °C until the measurement. To prepare serum solutions, we thawed the serum samples at room temperature for 10 min. Then, 20-fold diluted solution was prepared using the degassed water (in a ratio of 0.125 mL serum and 2.375 mL degassed water using an automatic pipette to obtain 2.5 mL total solution). The pH value of the tested aqueous serum solutions was about 7.0 ± 0.5 .

The DSC method

Differential scanning calorimetry (DSC) measurements of aqueous serum solutions were made using the VP-DSC microcalorimeter (MicroCal Co., Northampton, MA). Two scans were obtained for each sample in the temperature range 20 – 100 °C with a heating rate of 1 °C min⁻¹ and a pressure of about 1.7×10^5 Pa. All raw DSC curves were corrected for the water–water instrumental line. The next steps were normalization for the gram mass of protein and subtracting the linear baseline. The following thermodynamic parameters: temperatures (T_1 , T_2 , T_3) and excess heat capacities (Cp_1 , Cp_2 , Cp_3) of local maxima, the enthalpy (ΔH) of thermal denaturation of serum as the area under the endothermic peak and the width of peak in its half height (H/HW), were determined.

Statistics

Statistical analysis was carried out with the Statistica 13.1 program. After checking for normal distribution (tested by Shapiro–Wilk test), ANOVA with repeated measurements

has been used. Mauchly's test for sphericity was included as a part of the procedure. When the ANOVA with repeated measurements was statistically significant, the post hoc Tukey's test was performed. The level of statistical significance was set at $p < 0.05$. The T test for the dependent groups was performed to compare biochemical parameters before and after ten WBC treatments. Linear regression and Pearson's correlation coefficient (r) were used to evaluate the relationships between protein fractions, biochemical and thermodynamic parameters of blood serum.

Results and discussion

Thermal denaturation of human blood serum is observed in DSC measurements as the complex endothermic transition in the temperature range of 40 °C to 90 °C. It is the result of denaturation of the constituent proteins and represents the weighted sum of denaturation profiles of the individual proteins within serum. This transition is irreversible. Usually, two or three main peaks can be distinguished in the DSC profile of healthy human blood serum, depending on the solvent used [14–26].

In aqueous solution, the first peak with the contribution mainly from nonligated albumin is observed at about 57 °C. The second local maximum (not always visible), mainly derived from haptoglobin, appears at about 62 °C. In buffer solutions (pH 7.4), these two peaks merge into one centered at about 63 °C. The contribution from immunoglobulins reveals itself around 70 °C in both kinds of serum/plasma solutions. Each of these three peaks still contains small contributions from other serum proteins (alpha1-globulin, alpha2-globulin, beta1-globulin, beta2-globulin).

Figure 1 shows the averaged DSC curves of sera from each stage of the experiment: before WBC treatments (0 WBC), after one WBC treatment (1 WBC) and after series of ten WBC treatments (10 WBC). In all curves, we can observe local maxima at temperatures of about 57 °C, 62 °C and 70 °C. The peak at about 70 °C dominates over the less intense other two. The mean thermodynamic parameters for denaturation transition of athlete's serum are listed in Table 1. The HHW at each stage of the experiment was practically the same, about 25 °C.

DSC curves of blood serum collected from athletes before using WBC and after one treatment are very similar to each other, and slight differences between them are within the limits of experimental error. The differences are visible by comparing these curves with curve corresponding to serum collected after a series of ten WBC treatments. In the case of the first local maximum, after ten WBC treatments, its intensity is lower than before WBC and after

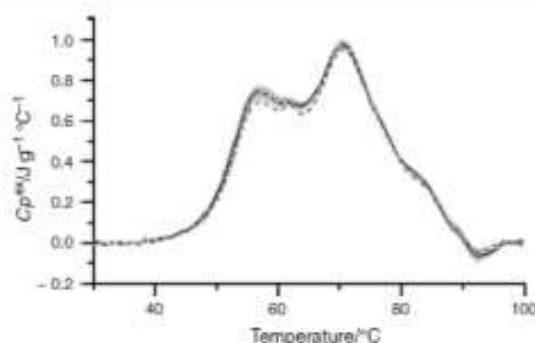


Fig. 1 Mean DSC curves: before WBC (solid line), after one WBC (short dots line), after a series of ten WBC treatments (short dash line)

one WBC treatment. The results of ANOVA with repeated measure ($p = 0.04$) have indicated statistically significant differences between mean values of Cp_1 in three considered stages of the experiment. Post hoc Tukey's test has shown statistically significant difference between Cp_1 without WBC and after ten WBC treatments ($p = 0.037$). Results shown in Table 1 suggest also a decrease in ΔH value after completing a total of ten whole-body therapy sessions, but this trend is not statistically significant.

A decrease in the intensity of the first local maximum (Cp_1) would suggest a decrease in the level of serum albumin in participants of this study. However, results from the electrophoresis show that this is a mistaken idea. Table 2 presents the average value of total protein and the average percentage of the most abundant proteins fractions in serum at each stage of the experiment. Results shown in this table suggest an increase in the percentage of serum albumin after cryostimulation treatments. Actually, ANOVA with repeated measure ($p = 0.03$) has indicated statistically significant differences between mean percentage of albumin in three stages of experiment; in particular, post hoc Tukey's test has shown significant difference between percentage of albumin before WBC and after ten WBC treatments ($p = 0.025$).

The exposure to WBC results in an elevated metabolism in order to increase heat production to protect the core of the body. The blood is enriched with nutrients, enzymes and oxygen intensively. Thus, more ligands are available to bind to albumin. This may lead to an increase in the ratio of ligated to unligated albumin molecules. A decrease of % content of nonligated albumin fraction, in spite of the increase in total albumin level after ten WBC, can lead to a decrease in Cp_1 value. We think that such perturbation of the shape of serum denaturation transition after a series of WBC treatments, corresponding to ligand interactions with serum albumin, would be visible regardless of belonging to

Table 1 Mean parameters (mean $\pm$ SD) of serum denaturation transition before WBC, after one WBC and after ten WBC treatments

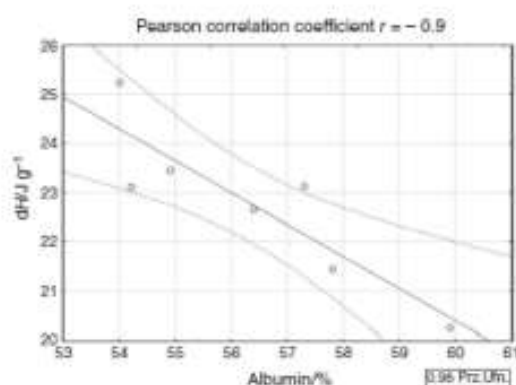
	$T_d/^\circ\text{C}$	$Cp_1/\text{J g}^{-1} ^\circ\text{C}^{-1}$	$T_d/^\circ\text{C}$	$Cp_2/\text{J g}^{-1} ^\circ\text{C}^{-1}$	$T_d/^\circ\text{C}$	$Cp_2/\text{J g}^{-1} ^\circ\text{C}^{-1}$	$\Delta H/\text{J g}^{-1}$
0 WBC	56.7 $\pm$ 1.2	0.764 $\pm$ 0.087	61.8 $\pm$ 0.6	0.701 $\pm$ 0.068	70.6 $\pm$ 0.2	0.977 $\pm$ 0.065	23.8 $\pm$ 1.4
1 WBC	57.3 $\pm$ 0.8	0.746 $\pm$ 0.070	61.9 $\pm$ 0.5	0.697 $\pm$ 0.054	70.5 $\pm$ 0.2	0.976 $\pm$ 0.054	23.0 $\pm$ 1.2
10 WBC	57.1 $\pm$ 0.6	0.698 $\pm$ 0.078	61.9 $\pm$ 0.5	0.683 $\pm$ 0.068	70.5 $\pm$ 0.3	0.960 $\pm$ 0.080	22.6 $\pm$ 1.5

Table 2 Mean value (mean $\pm$ SD) of total protein and percentage of albumin and gamma globulin in athlete's blood serum before WBC, after one WBC and after ten WBC treatments

	Total protein/g L ⁻¹	Albumin/%	Gamma globulin/%
0 WBC	78.59 $\pm$ 2.05	53.76 $\pm$ 1.13	15.53 $\pm$ 1.62
1 WBC	76.42 $\pm$ 3.45	54.98 $\pm$ 1.53	15.00 $\pm$ 1.40
10 WBC	76.71 $\pm$ 3.66	56.36 $\pm$ 2.15	14.93 $\pm$ 1.16

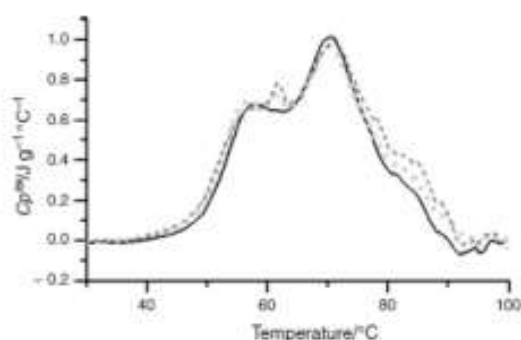
a group of athletes, due to an elevated level of endogenous ligand components in serum after WBC stimulation.

It seems noteworthy that after ten WBC treatments, negative correlation between percentage of albumin and ΔH value ($r = -0.9$ and $p = 0.008$) has been found (Fig. 2). This correlation shows that after ten WBC treatments, lower enthalpy of serum denaturation has been observed for athletes with higher percentage content of albumin in serum. As cryostimulation helps create extra oxygen in the bloodstream, it can result in increasing fraction of oxidized form of serum albumin. This form of albumin is characterized by lower enthalpy of denaturation than the nonoxidized one [28]. Higher percentage of albumin after ten WBC treatments entails higher level of oxidized albumin molecules and lower ΔH .

**Fig. 2** Scatter plot with matching regression line for ΔH and percentage of albumin in athlete's serum after ten WBC

Results shown in Table 2 suggest also a decrease in total protein value after completing a total of ten whole-body therapy sessions but this change was not statistically significant. The amount of gamma globulins has remained at a similar level despite cryostimulation treatments.

Changes in blood serum reflect an individual's metabolism. DSC thermal profiles of samples gathered in this study have shown that not everyone responded to cryostimulation in the same way. Figure 3 shows DSC curves for the athlete whose reaction was different from the one indicated by mean DSC curves presented in Fig. 1. The decrease in Cp_1 and ΔH values after WBC is not observed in this case. The main effect clearly visible in Fig. 3 concerns the second local maximum (T_2 , Cp_2). It is not present before the WBC treatments, reveals itself after one WBC treatment and becomes more intense after ten WBC treatments. The enhancement of this maximum may indicate the development of inflammation or injury because this peak shows the presence of an acute phase protein, haptoglobin. This protein belongs to alpha2-globulins whose percentage content began to increase after just one WBC treatment and remained elevated after ten WBC according to electrophoretic results for this athlete. The elevated value of blood creatine kinase (CK), which is a sensitive index of skeletal muscle injuries [29], has been also found for this cross-country skier. It may suggest that he has suffered injury during his daily trainings.

**Fig. 3** DSC curves for the athlete whose response to WBC was unusual: before WBC (solid line), after one WBC (short dots line), after a series of ten WBC treatments (short dash line)

A side result of our studies is the suggestion that WBC has the effect of reducing the amount of body fat. This is not a quite new discovery that cryostimulation can help in mass loss. To reheat the body and to maintain body temperature after WBC, the metabolism is accelerated, which allows increased caloric burning. A controlled cold stimulation is used for destruction of fat cells. Currently, cryolipolysis is widely used to achieve mass loss effects [30].

Despite the small group in the current study, the *T* test for dependent samples showed statistically significant decrease ($p = 0.022$) of the mean value of fat mass (from 9.3 ± 2.9 kg before treatments to 8.2 ± 3.6 kg after ten WBC treatments). A similar result was obtained for % fat content ($p = 0.026$). Additionally, a high positive correlation ($r = 0.74$ and $p = 0.037$) between the change in Cp_1 value ($\text{diff } Cp_1 = Cp_1 \text{ before WBC} - Cp_1 \text{ after ten WBC}$) and the corresponding relative change in body fat mass after ten WBC treatments has been found (Fig. 4). It suggests that the decrease in relative fat mass observed in most cases after WBC is accompanied by the decrease in Cp_1 parameter of serum denaturation transition. The decrease in Cp_1 has been suggested to be associated with the change in albumin fractions ratio. The question arises whether this is the only possible explanation. The other important issue seems to be the relationship between changes in fat mass and the content of particular protein fractions in athlete's blood serum. So, the next step of the analysis was an attempt to find such connections. According to Geyer et al. results, the mass loss changes multiple components of the plasma proteome [31, 32]. They reported a significant increase in albumin and a decrease in some proteins of special clinical interest, mainly apolipoproteins and markers of inflammation, concomitantly with mass loss.

In this study, the high, statistically significant correlations have been found between the relative change in body

fat mass after ten WBC treatments and the change (difference between the concentration of considered protein fraction before WBC and after ten WBC treatments) in the level of alpha2-globulins ($r = 0.82$ and $p = 0.023$) and beta2-globulins ($r = 0.91$ and $p = 0.004$). Both of these correlations are positive. This suggests a down-regulation of proteins from these fractions in response to the loss of fat mass. The alpha2-globulin fraction includes proteins such as alpha2-macroglobulin, haptoglobin and ceruloplasmin, while to the beta2-globulin fraction belong beta2-microglobulin and beta-lipoproteins.

Recently, Polidori et al. [33] have shown that the body fat content affects the effectiveness of whole-body cryotherapy. They suggested that women are more sensitive to the extreme cold than men due to the greater inner thermal resistance connected with a higher concentration of body fat percentage. The difference in adaptive thermogenesis between lean and obese people has been reported by Wijers et al. [34]. Their studies have revealed that most obese subjects counteracted the cold by increasing insulation, while the lean subjects predominantly increased energy expenditure. However, they found large interindividual differences in the relative contribution of both mechanisms.

Only two women participated in our study. Their body fat percentage was higher than for all male participants and practically did not change after the WBC session. Therefore, females' response to WBC relating to fat mass was different compared to male. Cross-country skiers are rather slim people, and they have little fat and a lot of skeletal muscles. So, they react to extreme cold temperatures mainly by increase in energy expenditure which leads to a caloric deficit and next to a reduction in fat. This effect seems to be undesirable for athletes who are exposed to changing environmental conditions taking part in competitions held in different parts of the world.

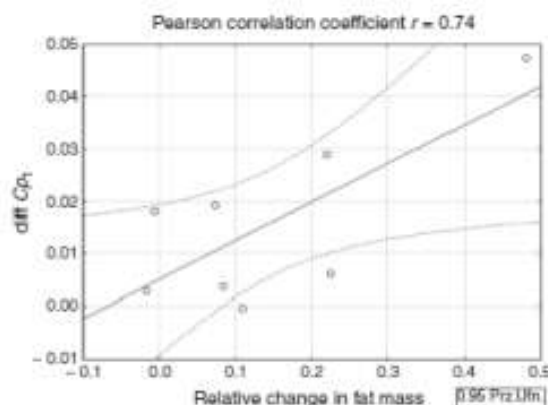


Fig. 4 Scatter plot with matching regression line for $\text{diff } Cp_1$ and relative change in fat mass

Conclusions

DSC results indicate that whole-body cryostimulation affects blood serum of professional cross-country skiers. The intensity of the endothermic transition connected with serum denaturation decreases after the cryostimulation cycle, particularly in the low temperature range of this transition. The decrease in Cp_1 mean value after the whole series of ten WBC treatments has been found statistically significant. As this low-temperature region of the complex transition corresponds principally to the denaturation of unligated albumin, this result has indicated a decrease in this form of albumin. With regard to the results of electrophoretic assay that total albumin level has increased after the ten WBC treatments, the possible explanation is

that the decrease in the number of ligands-free albumin molecules is accompanied by an increased fraction of albumin with bound ligands, including oxidized albumin. An increasing fraction of oxidized form of serum albumin is in line with the fact that cryostimulation helps create extra oxygen in the bloodstream. The higher level of oxidized albumin molecules for which enthalpy of denaturation is lower than for nonoxidized one is in accordance with a decrease in ΔH (although not statistically significant) after ten WBC treatments.

Unexpectedly, statistically significant, high positive correlation between the change in Cp_1 and the relative change in body fat mass after ten WBC treatments has been found. Similar correlations have occurred between the relative change in body fat mass after ten WBC treatments and the corresponding changes in alpha2-globulins and beta2-globulins levels, suggesting the down-regulation of proteins from these fractions in response to the loss of fat mass as a result of cryostimulation. A larger number of blood serum samples would be required for future verification of this conclusion.

Funding The project has been financed by the grant Ministry of Science and Higher Education/Nr 0050/RS4/2016/54.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

References

- Solli GS, Tønnessen E, Sandbakk Ø. The training characteristics of the world's most successful female cross-country skier. *Front Physiol.* 2017. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.01069>.
- McGawley K, Holmberg H-Cl. Aerobic and anaerobic contributions to energy production among junior male and female cross-country skiers during diagonal skiing. *Int J Sports Physiol Perform.* 2014;9:32–40.
- Sandbakk Ø, Holmberg HC. Physiological capacity and training routines of elite cross-country skiers: approaching the upper limits of human endurance. *Int J Sports Physiol Perform.* 2017;12:1003–11.
- Pellegrini B, Zoppiroli C, Bortolan L, Holmberg HC, Zamparo P, Schena F. Biomechanical and energetic determinants of technique selection in classical cross-country skiing. *Hum Mov Sci.* 2013;32:1415–29.
- Lombardi G, Ziemann E, Banfi G. Whole-body cryotherapy in athletes: from therapy to stimulation. An updated review of the literature. *Front Physiol.* 2017. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00258>.
- Lubkowska A, Szygula Z, Chłubek D, Banfi G. The effect of prolonged whole-body cryostimulation treatment with different amounts of session on chosen pro- and anti-inflammatory cytokines levels in healthy men. *Scand J Clin Lab Invest.* 2011;71:419–25.
- Banfi G, Melegati G, Barassi A, Melzi d'Eril G. Beneficial effects of the whole-body cryotherapy on sport haemolysis. *J Hum Sport Exerc.* 2009;2:189–93.
- Banfi G, Lombardi G, Colombini A, Melegati G. Whole-body cryotherapy in athletes. *Sports Med.* 2010;40(6):509–17.
- Ferreira-Junior JB, Bottaro M, Loenneke JP, Vieira A, Vieira Carlos A, Bemben MG. Could whole-body cryotherapy (below – 100 °C) improve muscle recovery from muscle damage? *Front Physiol.* 2014. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00247>.
- Stanek A, Sieroń-Stoltny K, Romuk E, Cholewka A, Wielkoszyński T, Cieślak G, Kwiatek S, Sieroń A, Kawczyk-Krupka A. Whole-body cryostimulation as an effective method of reducing oxidative stress in healthy men. *Adv Clin Exp Med.* 2016;25(6):1281–91.
- Ziemann E, Olek RA, Kujach S, Grzywacz T, Antosiewicz J, Garszka T, Laskowski R. Five-day whole-body cryostimulation, blood inflammatory markers, and performance in high-ranking professional tennis players. *J Athl Train.* 2012;47(6):664–72.
- Jonak A, Skrzek A. Krioterapia w odnowie biologicznej sportowców—przebieg badań. Cryotherapy in athletes' biological regeneration—review. *Acta Bio-Optica et Informatica Medica.* 2009;15:319–21.
- Rosato M, De Souza Bezerra E, de Cevalles Seixas da Silva DA, Avila Santana T, Rafael Malezam W, Carpes FP. Effects of cryotherapy on muscle damage markers and perception of delayed onset muscle soreness after downhill running: a pilot study. *Revista Andaluza de Medicina del Deporte.* 2015;8(2):49–53.
- Stanek A, Cholewka A, Wielkoszyński T, Romuk E, Sieroń A. Decreased oxidative stress in male patients with active phase ankylosing spondylitis who underwent whole-body cryotherapy in closed cryochamber. *Oxid Med Cell Longev.* 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/7365490>.
- Garbett NC, Miller JJ, Jensen AB, Chaires JB. Calorimetry outside the box: a new window into the plasma proteome. *Biophys J.* 2008;94:1377–83.
- Velazquez-Campoy A, Vega S, Sanchez-Gracia O, Lanas A, Rodrigo A, Kaliappan A, Hall MB, Nguyen TQ, Brock GN, Chesney JA, Garbett NC, Abian O. Thermal liquid biopsy for monitoring melanoma patients under surveillance during treatment: a pilot study. *BBA Gen Subj.* 2018;1862:1701–10.
- Garbett NC, Mekmaysy CS, Helm CW, Jensen AB, Chaires JB. Differential scanning calorimetry of blood plasma for clinical diagnosis and monitoring. *Exp Mol Pathol.* 2009;86:186–91.
- Garbett NC, Brock GN. Differential scanning calorimetry as a complementary diagnostic tool for the evaluation of biological samples. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2016;1860:981–9.
- Todnova S, Krumova S, Danailova A, Petkova V, Guenova M, Mihaylov G, Gatcheva L, Taneva SG. Calorimetric markers for monitoring of multiple myeloma and Waldenström's macroglobulinemia patients. *Eur Biophys J.* 2018;47:549–59.
- Michnik A, Sadowska-Krupa E, Cholewa J, Schider I, Kielbaso A, Drzażga Z. Differential scanning calorimetry study of early and advanced stages in Parkinson's disease using human blood serum. *Thermochim Acta.* 2018;662:64–8.
- Kędra-Królik K, Chmielewska I, Michnik A, Zarzycki P. Blood serum calorimetry indicates the chemotherapeutic efficacy in

- lung cancer treatment. *Sci Rep*. 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17004-x>.
22. Zapf I, Fekecs T, Ferencz A, Tizedes G, Pavlovics G, Kalman E, Lőrinczy D. DSC analysis of human plasma in breast cancer patients. *Thermochim Acta*. 2011;524:88–91.
 23. Fekecs T, Zapf I, Ferencz A, Lőrinczy D. Differential scanning calorimetry (DSC) analysis of human plasma in melanoma patients with or without regional lymph node metastases. *J Therm Anal Calorim*. 2012;108:149–52.
 24. Farkas P, Kőncsöl F, Lőrinczy D. New possibilities of application of DSC as a new clinical diagnostic method. *J Therm Anal Calorim*. 2018;133:579–89.
 25. Michnik A, Drzazga Z, Poprzęcki S, Czuba M, Kempa K, Sadowska-Krepa E. DSC serum profiles of sportsmen. *J Therm Anal Calorim*. 2013;113:365–70.
 26. Michnik A, Sadowska-Krepa E, Domaszewski P, Dach K, Pokora I. Blood serum DSC analysis of well-trained men response to CrossFit training and green tea extract supplementation. *J Therm Anal Calorim*. 2017;130:1253–62.
 27. Michnik A, Drzazga Z, Schisler I, Poprzęcki S, Czuba M. Diversity in athlete's response to strength effort in normobaric hypoxia. *J Therm Anal Calorim*. 2018;134:633–41.
 28. Gorobets MG, Wasserman LA, Vasilyeva AD, Bychkova AV, Pronkin PG, Bugnova AE, Indeykina MI, Shilkina NG, Konstantinova ML, Kononikhin AS, Nikolaev EN, Rosenfeld MA. Modification of human serum albumin under induced oxidation. *Dokl Biochem Biophys*. 2017;474(1):231–5.
 29. Takagi Y, Yasuhara T, Gomi K. Creatine kinase and its isozymes. *Rinsho Byon Jpn J Clin Pathol*. 2001;116:52–61.
 30. Meyer PF, Valentim da Silva RM, Oliveira G, Azevedo da Silva Tavares M, Medeiros ML, Andrada CP, de Araujo Neto LG. Effects of cryolipolysis on abdominal adiposity. *Case Rep Dermatol Med*. 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/6052194>.
 31. Geyer PE, Kulak NA, Pichler G, Holdt LM, Teupser D, Mann M. Plasma proteome profiling to assess human health and disease. *Cell Syst*. 2016;2:185–95.
 32. Geyer PE, Wewer Albrechtsen NJ, Tyanova S, Gravid N, Jepson EW, Lundgren J, Madsbad S, Holst JJ, Torekov SS, Mann M. Proteomics reveals the effects of sustained weight loss on the human plasma proteome. *Mol Syst Biol*. 2016. <https://doi.org/10.15252/msh.20167357>.
 33. Polidori G, Cuttelli S, Hammond L, Langdon D, Legrand F, Tazir R, Boyer FC, Costello JT. Should whole body cryotherapy sessions be differentiated between women and men? A preliminary study on the role of the body thermal resistance. *Med Hypotheses*. 2018;120:60–4.
 34. Wijers SLJ, Saris WHM, van Marken Lichtenbelt WD. Cold-induced adaptive thermogenesis in lean and obese. *Obes J*. 2010;18:1092–9.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Anna Michnik

Chorzów, 01.06.2022

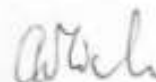
Instytut Fizyki, Uniwersytet Śląski

ul. 75 Pułku Piechoty 1a, 41-500 Chorzów

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Duch K, Michnik A, Pokora I, Sadowska-Krępa E, Kielboń A, *Whole-body cryostimulation impact on blood serum thermal denaturation profiles of cross-country skiers*, in: *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, vol. 138, Springer International Publishing, DOI 10.1007/s10973-019-08766-9, Print ISSN 1388-6150, Electronic ISSN 1588-2926, 2019, pp 4505–4511 mój udział polegał na: nadzorowaniu badań DSC, czynnym udziale w opracowaniu i analizie wyników, czynnym udziale w napisaniu i edycji manuskryptu.



Podpis

Ilona Pokora

Chorzów, 01.06.2022

Zakład Fizjologii, Katedra Nauk Fizjologicznych i Medycznych

Akademia Wychowania Fizycznego im. J. Kukuczki

ul. Mikołowska 72a, 40-065 Katowice

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Duch K, Michnik A, Pokora I, Sadowska-Krępa E, Kielboń A, *Whole-body cryostimulation impact on blood serum thermal denaturation profiles of cross-country skiers*, in: Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, vol. 138, Springer International Publishing, DOI 10.1007/s10973-019-08766-9, Print ISSN 1388-6150, Electronic ISSN 1588-2926, 2019, pp 4505–4511 mój udział polegał na: stworzeniu koncepcji projektu badawczego, organizacji badań, w tym rekrutacji uczestników oraz nadzorze nad prowadzonymi badaniami i czynnym udziale w pisaniu i edycji manuskryptu.



Podpis

Ewa Sadowska-Krępa

Chorzów, 01.06.2022

Katedra Nauk Fizjologicznych i Medycznych

Akademia Wychowania Fizycznego im. J. Kukuczki

ul. Mikołowska 72a, 40-065 Katowice

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Duch K, Michnik A, Pokora I, Sadowska-Krępa E, Kielboń A, *Whole-body cryostimulation impact on blood serum thermal denaturation profiles of cross-country skiers*, in: Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, vol. 138, Springer International Publishing, DOI 10.1007/s10973-019-08766-9, Print ISSN 1388-6150, Electronic ISSN 1588-2926, 2019, pp 4505–4511 mój udział polegał na: nadzorze nad prowadzonymi badaniami biochemicznymi, czynnym udziale w analizie badań biochemicznych, czynnym udziale w pisaniu i edycji manuskryptu.



Podpis

Agnieszka Kielboń

Chorzów, 01.06.2022

Instytut Fizyki, Uniwersytet Śląski

ul. 75 Pułku Piechoty 1a, 41-500 Chorzów

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Duch K, Michnik A, Pokora I, Sadowska-Krępa E, Kielboń A, *Whole-body cryostimulation impact on blood serum thermal denaturation profiles of cross-country skiers*, in: Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, vol. 138, Springer International Publishing, DOI 10.1007/s10973-019-08766-9, Print ISSN 1388-6150, Electronic ISSN 1588-2926, 2019, pp 4505–4511 mój udział polegał na: wykonaniu części pomiarów DSC, czynnym udziale w analizie wyników, czynnym udziale w edycji manuskryptu.

Agnieszka Kielboń
Podpis

5.3. Michnik A, Pokora I, Duch K, Sadowska-Krępa E. Differential scanning calorimetry reveals that whole-body cryostimulation in cross-country skiers can modify their response to physical effort. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry (2021, 143, 255–264), doi 10.1007/s10973-020-09285-8

Impact Factor czasopisma: 4.626.

Liczba punktów ministerialnych MEiN: 100 pkt.

DOI: 10.1007/s10973-020-09285-8

Mój udział w załączonym artykule polegał na: wykonaniu pomiarów DSC, czynnym udziale w opracowaniu i analizie wyników, czynnym udziale w edycji manuskryptu.

Wkład pozostałych współautorów, w formie oświadczeń, zamieszczono na końcu artykułu.



Differential scanning calorimetry reveals that whole-body cryostimulation in cross-country skiers can modify their response to physical effort

Anna Michnik¹ · Ilona Pokora² · Klaudia Duch¹ · Ewa Sadowska-Krepa²

Received: 12 March 2019 / Accepted: 3 January 2020 / Published online: 14 January 2020
© The Author(s) 2020

Abstract

In sport medicine, cryostimulation is used to help athletes to better support the training workload, to prevent the deleterious effects of strenuous exercise and to improve recovery. In this study, eight elite cross-country skiers had two experimental exercise sessions differing in that the second one was carried out after a series of 10 whole-body cryostimulation (WBC) treatments. Differential scanning calorimetry (DSC) was applied to compare changes in athlete's blood serum during both sessions. Mean DSC curves of serum collected in four stages of the training session: before exercise, after exercise, at 1 h recovery and after 24 h of rest have shown a similar nature of post-exercise changes and recovery regardless of the WBC. Statistically significant effect of the exercise, reflected in some parameters of serum denaturation transition, has been found. Too small number of participants in our study did not allow to verify the hypothesis that WBC favorably modifies athletes' reaction to the effort and improves post-exercise recovery, but such trends emerged.

Keywords DSC · Exercise · Human blood serum · Whole-body cryostimulation

Introduction

Whole-body cryotherapy was initially intended as a treatment for several diseases, e.g. rheumatoid arthritis, fibromyalgia and ankylosing spondylitis. Recently, this treatment covers a wide range of therapeutic applications. In contrast to cryotherapy, where a therapeutic aim is emphasized, the term "cryostimulation" is increasingly often used to highlight the stimulatory effect of cryogenic temperatures. It has gained popularity, particularly among athletes, as a recovery strategy following different sports activities. The cryostimulation has been employed by elite and recreational athletes to attenuate the negative impact of strenuous physical activity on subsequent exercise. The anti-inflammatory

and analgesic effects of WBC are the most searched for by athletes and patients. Recent studies have confirmed these and other beneficial effects of extremely low temperatures in athletes [1–8].

In cold stress, heat loss is prevented by peripheral vasoconstriction (reflex cutaneous vasoconstriction) and heat production implemented by shivering and uncoupled mitochondrial activity [9, 10]. Acute cold exposure causes powerful autonomic homeostatic responses in order to prevent heat loss and to maintain core body temperature. Cutaneous vasoconstriction and shivering thermogenesis are most important and are particularly powerful responses when both superficial and deep thermoreceptors are cooled simultaneously [11].

In contrast to acute responses, long-term adjustments require altered cellular functions, which are the basis of optimized performance of organs and the entire organism, and which include altered regulation of metabolic pathways as well as altered gene and protein expression. It is possible that a series of sessions of whole-body cold exposure may lead to the activation of antioxidant defense mechanisms in the body [12–16].

Most studies investigated the effect of WBC on functional recovery from exercise-induced muscle damage. Purnot

Anna Michnik
anna.michnik@us.edu.pl

¹ Faculty of Science and Technology, The Silesian Centre for Education and Interdisciplinary Research, University of Silesia in Katowice, ul. 75 Pułku Piechoty 1A, 41-500 Chorzów, Poland

² The Jerzy Kukuczka Academy of Physical Education in Katowice, Institute of Sport Sciences, ul. Mikolowska 72a, 40-065 Katowice, Poland

et al. [17] compared recovery using WBC treatments to passive recovery, and they found that WBC significantly decreased inflammatory cytokines and increased levels of anti-inflammatory cytokines compared to passive recovery. Other studies reported that the regular use of cryostimulation after training may lead to easier muscle fiber repair as well as a decrease of a creatine kinase (CK) activity in blood serum [4, 18, 19]. Unlike these studies, both Hausswirth [20] and Fonda [21] found no significant changes in CK with protocols using either three or six exposures to WBC, respectively.

The effect of only single WBC intervention prior to exercise on parameters of oxidative and inflammatory responses was studied by Miła-Kierzenkowska et al. [22]. Their results allow to conclude that the magnitude of exercise-induced oxidative stress may be partly reduced even by single session of WBC applied prior to the submaximal exercise. Pournot et al. [17] reported that a single exposure to WBC significantly alleviated inflammation after a strenuous exercise run. They observed also reduced CRP-levels 24 h after one session of WBC compared to passive recovery in equally trained participants. In contrast to these findings, the results of the recent Krueger et al. study [23] have shown that WBC following high-intensity intermittent exercise did not alter hormonal, inflammatory or muscle damage biomarkers in trained males. Costello reported that there was no significant change in pain measurements during recovery with WBC [24]. The results obtained by Vieira et al. [25] indicate that one session of WBC had no effect on vertical jump following a high-intensity exercise compared with a control condition. According to Wilson's et al. [26] findings, WBC was no more effective than a placebo intervention at improving functional recovery or perceptions of training stress following a marathon. In their meta-analysis, Costello et al. [27] did not have sufficient evidence to recommend WBC for preventing muscle soreness.

Thus, despite its widespread adoption in sport and exercise medicine, it remains a moot point as to whether WBC treatments improve recovery and have a beneficial effect on athletic performance. The topic of post-exercise recovery from training has been the focus of recent attention in systematic reviews [1, 5, 27–29]. Possibilities to facilitate the recovery process after exercise and the physical, psychological and physiological effects of WBC can probably depend, among others on the type of sport being practiced. The interaction between sport-specific skill performance, the training load, subsequent fatigue and adaptation is complex and may be modulated (positively or negatively) by the recovery strategy [30].

In eccentric exercise metabolic demand, VO_2 and blood lactate production are lower than during concentric exercise at similar muscle mechanical tension [31–33]. Skeletal muscles appear to be injured by exercise that involved

lengthening contractions as eccentric activity [34]. In contrast to eccentric exercise, high-intensity concentric muscle contractions lead to metabolic stress of the exercising muscles, and short, temporary muscle fatigue but no to significant muscle damage [35, 36]. During dynamic exercise, the muscle performs both concentric and eccentric actions; however, different models of exercises might presumably induce the same degree of inflammatory effects whereby the degree of affect appears to be related to exercise duration, intensity and muscle mass involved to the mechanical work. Research objects in our work are cross-country skiers. The cross-country skiing is a relatively complex, demanding endurance sport involving several different, rapidly developing sub-techniques. It involves upper-, lower- or whole-body exercise to improve performance and endurance capacities. The associated demands require regular scientific evaluation in order to provide both coaches and skiers with the basic "tools" necessary for the development of optimal training programs.

Recovery implies the application of diverse procedures that can enable the quick regeneration of athletes and the re-establishment of homeostasis, which the previous exertion has disturbed. Main functions of recovery are as follows: normalization of biological functions in an athlete's organism, normalization of the homeostatic balance and restoration of energy supply reserves with the establishment of temporary supercompensation. In sports medicine, WBC is used to improve recovery from muscle injury. In present work, we were interested in whether the application of 10 WBC treatments can prevent the onset of overload and overtraining and would have an effect on the plasma proteome. Such empirical studies are lacking.

In this study, an unconventional approach was used to examine the influence of WBC treatments on the response of elite cross-country skiers to the physical effort and on recovery of athletic performance following exercise. The differential scanning calorimetry (DSC) method has been employed to compare changes in DSC profiles of blood sera in the same stages of the training cycle in two sessions. The first exercise session was carried out without cryostimulation. The second session took place after 10 WBC treatments. So, to evaluate the effect of WBC, sera from the same athletes were tested twice in 4 stages: before exercise, after exercise, after 1 h and after 24 h of passive recovery.

The utility of DSC method for clinical application (diagnosing, classifying and monitoring patients) and in sport medicine is extensively discussed by scientists in recent years [37–55]. DSC has been widely applied to the analysis of blood plasma, serum or other biofluids to obtain information on the health status of the person examined. This technique allows to monitor heat capacity changes associated with the thermal denaturation of biomolecules. A DSC profile of plasma/serum reflects the global denaturation

profile for all proteins present in the sample. It is sensitive to the up- or down-regulation of proteins and the modified thermal stability of major proteome components resulting from changes in interactions between blood plasma/serum proteins and disease-related metabolites. Earlier data from our laboratory have indicated that exercise training can also modulate the calorimetric profile of blood serum [53–55].

Materials and methods

Participants

The well-trained 8 cross-country skiers (2 women and 6 men) took part in our experiment during the transition period (TP) of the annual training cycle. During TP, the cross-country skiers were subjected to strict control regarding their diet, exercise and recovery by the team of trainers, that is, coaches, a physician, and two sport dietitians. The main characteristics of the cross-country skiers are presented in Table 1. The athletes performed specialized physical training. In cross-country skiers, the annual training plan is traditionally divided on three main macrocycles: preparatory, competitive and transition periods. Such plan is based

on the concept of periodization, which has to be viewed as an important concept to follow maximize athletes' performance. This study was performed during the transient phase of the annual training program (during the regeneration microcycle). Description of the training structure (training volume and distribution of workout intensities) in the transition phase of the annual training program for cross-country skiers (the athletes in our study) is presented in Table 2.

Preliminary test for the determination of $\text{VO}_{2\text{max}}$ and individual anaerobic threshold

One week prior to the start of the experiment body composition, aerobic fitness (maximal oxygen uptake, $\text{VO}_{2\text{max}}$) and individual anaerobic threshold (AT) were determined for each participant. Physiological variables, such as $\text{VO}_{2\text{max}}$, together with other submaximal metabolic inflection points (e.g. the anaerobic threshold) are quantified by sports scientists during an incremental exercise test to exhaustion (GXT). These variables have been shown to correlate with endurance performance. All competitors reported to the physical testing laboratory for an incremental running test on a treadmill (LE 200, Jaeger) to assess anaerobic threshold and peak oxygen uptake ($\text{VO}_{2\text{max}}$) using a stationary breath-by-breath metabolic unit (MetaLyzer 3B-R2, Cortex). The exercise test started with a speed of 6 km h^{-1} that was increased by 2 km h^{-1} every 3 min until the speed reached 14 km h^{-1} . Exercise intensity was then increased by adjusting treadmill incline by 2.5% every 3 min until subject's volitional exhaustion [56]. The lactate threshold was determined by the D-max method [57]. During GXT test, heart rate (HR), oxygen uptake (VO_2) and blood lactate concentration were recorded. HR corresponded to exercise intensity at AT was determined (HR-AT). HR-AT was used to appropriate exercise intensity estimation, which was accordingly used during experimental tests. The study was approved by the Research Ethics Committee at the Academy of Physical Education in Katowice, Poland.

Table 1 Characteristics of participants

	Before WBC	After 10 WBC sessions
Age/year	22.8 ± 2.9	22.8 ± 2.9
Height/cm	176.6 ± 10.9	176.6 ± 10.9
Body mass/kg	73.7 ± 9.7	73.5 ± 9.4
Body fat mass/kg	$9.3 \pm 2.9^*$	$8.2 \pm 3.6^*$
Body fat mass/%	$13.1 \pm 5.8^{**}$	$11.8 \pm 6.7^{**}$
Skeletal muscle mass/kg	36.8 ± 7.1	37.3 ± 7.4
$\text{VO}_{2\text{max}}/\text{ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$	60.1 ± 8.4	n.a.

Values are means $\pm$ SD; statistically significant differences: * $p=0.02$, ** $p=0.03$

Table 2 Description of the transition phase of the annual training plan

Total training		Transition phase/TP phase/april to may	
Training volume	Frequency, times duration	5 days week ⁻¹	7–10 h week ⁻¹
	Intensity distribution	Range I—72% Range II—17% Range III—8% Range IV—3% Range V—0% April to May Regeneration unloading or tapering microcycle—which allows rest and recovery from the season but emphasizes cross-training to avoid complete detraining.	1 session day ⁻¹

Intensity zones were used for description of workout intensities: I-low-aerobic/active recovery; II-moderate; III-moderate-intensity; IV-vigorous-intensity, submaximal; V-maximal-intensity

Experimental exercise test (EET test)

The main physical effort used in these studies was 1 h of uninterrupted running exercise (EET) performed in thermoneutral conditions. The participants performed continuous EET test twice, before and after a series of 10 WBC. The EET test was performed at predetermined intensity, below HR-AT for 60 min. Two similar exercise tests, at a given intensity, were allowed to determine subjects' response to similar physical efforts before and after WBC therapy. During these exercise tests, subjects kept the steady speed of run, corresponding to 85–88% of HR-AT. All exercise tests were performed in Research Center for Sports, Academy of Physical Education in Katowice under thermoneutral environmental conditions (an ambient temperature 21–24 °C and a relative humidity 45–55%) at the same time of day (8.00–14.00) to minimize the circadian rhythm effects, before and after of 10 WBC treatments.

Whole-body cryostimulation procedure

Prior to the start of the experiment, each participant was examined by a physician to test for any contraindications against cryostimulation. Cryostimulation was performed in a cryo-chamber located in Upper Silesian Center of Medicine and Rehabilitation in Katowice. The treatment sessions were performed at temperature -130°C once a day for 10 following days, excluding Saturdays and Sundays. Each session of whole-body cryostimulation lasted 3 min. The cryostimulation treatments took place at the same time, between 2 pm and 6 pm. The subjects entered the chamber in groups of five persons. Entry to the cryo-chamber was preceded by a 30-s adaptation period in the vestibule at a temperature of -60°C , from which the subjects went further to the proper chamber, where they moved slowly in a circle, one after the other, without mutual contact, no additional movement or talking. After a minute, a change in the direction of motion was recommended. Contact with the participants was maintained via a camera in the room and voice contact.

Blood serum

Venus blood samples from the antecubital vein were drawn into tubes without anticoagulant at four time points: at rest (before the exercise—"be"), 3 min after the exercise ("ae"), after 1 h ("r1h") and again 24 h ("r24h") of recovery to process for serum. Serum samples were stored at -20°C . Blood samples were assayed for total protein content, albumin, α_1 , α_2 , β_1 , β_2 and γ globulins. Immediately before the DSC measurements, each serum sample was thawed out at room temperature. Then 20-fold diluted serum solution was prepared using the redistilled and degassed water. The pH

values of the diluted serum samples were within the range 6.5–7.0.

Differential scanning calorimetry

DSC measurements were conducted using the VP DSC MicroCal instrument (Northampton, MA) in the temperature range 20–100 °C with the heating rate $1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ and a pre-scan equilibration time 15 min. A constant pressure of about 1.7×10^5 Pa was exerted on the liquids in the cells. Two scans were obtained for every sample. The calorimetric data were corrected for the instrumental baseline water–water. DSC curves were normalized for the gram mass of protein, and next, a linear baseline was subtracted. An apparent excess specific heat capacity C_p^{ex} ($\text{J }^{\circ}\text{C}^{-1} \text{g}^{-1}$) versus temperature ($^{\circ}\text{C}$) has been plotted.

The following parameters of observed DSC transitions have been determined: temperatures of local peak maxima T_m ($m = 1, 2, 3$), excess specific heat capacities at these temperatures $C_{p,m}$, the enthalpy (ΔH) of serum denaturation (calculated as the area under the endothermic peak, expressed in J g^{-1}) and the width of peak in its half height (HHW).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the Statistica 13 software. For all measures, descriptive statistics were calculated. To compare parameters before and after the WBC, t test for dependent variables was applied. The Shapiro–Wilk test was used to check the normality of distributions of the studied variables. The homogeneity of variances in analyzed groups was verified by Leven's test. Analysis of variance (ANOVA) with the period of training cycle as a repeated measure was used. Mauchly's test for sphericity was included as a part of the procedure. If repeated measures ANOVA was statistically significant, Tukey's post hoc test was applied. The level of statistical significance was set at $p < 0.05$, and results with $p < 0.1$ were interpreted as tendencies.

Pearson's correlation coefficients were found to describe the relationships between biochemical and thermodynamic blood serum parameters.

Results and discussion

According to our and other previous reports [37–40, 47, 48, 53–55], two or three relatively well-resolved thermal transitions are observed in DSC profiles of blood sera from healthy individuals, depending on the solvent used. Roughly,

in buffer (pH 7.4) solution, peaks around 62 °C and 70 °C reflect the thermal denaturation of the most abundant serum proteins, albumin and immunoglobulin, respectively. In such solution, an un-liganded albumin unfolds in higher temperature range and its transition is more cooperative than in aqueous solution. For sera denaturation in aqueous solution, three relatively well-resolved transitions can be usually observed. The first one, at about 58 °C, mainly represents the contribution from un-liganded albumin, while the third one at about 70 °C, just like in buffer solutions, comes from denaturation of immunoglobulin. The sharp peak at about 62 °C is not always visible. It has its origin mainly in haptoglobin, the acute-phase protein belonging to alpha-2 globulins fraction.

Figure 1 shows the mean DSC curves of serum from blood acquired before exercise, after exercise, after an hour of rest and 24 h of rest before WBC treatments. It is clearly visible that the DSC curve corresponding to serum after the exercise stands out from the others. This indicates that fatigue developed during the exercise is reflected in the blood serum. The impact of the effort is manifested by opposite changes in two temperature regions of the endothermic transition: a decrease of the intensity in the low (50–60 °C) and an increase in the high (65–80 °C) temperature range. The additional effect observed after the exercise in serum DSC curves is the exothermic transition visible above 85 °C. It suggests increased aggregation of serum proteins following their endothermic unfolding. This effect persists after an hour of rest, but disappears after 24 h of rest.

After applying the series of 10 WBC treatments, the calorimetric behavior of blood sera of athletes that underwent training exercises was very similar to that shown in Fig. 1. The nature of the mean changes connected with the effort and post-exercise recovery practically did not change after WBC (therefore, the results are not shown in the additional figure). Figure 2 illustrates the mean pre-exercise serum

DSC curves before and after 10 WBC treatments and the differences between post-exercise and pre-exercise curves in both training sessions. On first sight, some differences between mean pre-exercise DSC curves before and after 10 WBC treatments are visible, while the response to the effort, reflected in serum heat capacity changes, seems to be the same, regardless of the application of cryostimulation.

Tables 3 and 4 illustrate mean ($\pm$ SD) values of thermodynamic parameters in subsequent stages of the training cycle (before and after the exercise, after 1 h and 24 h of rest) conducted without WBC treatments and after 10 WBC treatments, respectively. Statistically significant differences between parameters in both sessions have been found only for Cp_1 . Lower values of Cp_1 have been observed both before ($p=0.02$) and after exercise ($p=0.04$) when cryostimulation was included.

To establish whether calorimetric parameters of serum denaturation transition reflect the effect of fatigue and the status of athletes after the rest, ANOVA with the stage of training cycle as the factor of repeated measurements was carried out. The results have indicated statistically significant differences for mean values of T_1 ($p=0.015$), Cp_1 ($p=0.04$), T_3 ($p<0.001$) and Cp_3 ($p=0.014$) when the exercise was performed without WBC treatments. The post hoc Tukey's test has shown significant increase of T_1 ($p=0.018$), T_3 ($p<0.001$) and Cp_3 ($p=0.011$) after the exercise as well as significantly lower mean value of Cp_1 immediately after the exercise than after 24 h of rest ($p=0.034$). Additionally, T_3 has been indicated higher after the exercise than after 1 h and 24 h recovery periods ($p<0.001$ in both cases). Differences between parameters corresponding to exercise and recovery stages after 10 WBC treatments are of a similar nature to these described above, but statistical significance has been found only for Cp_1 between "ac" and "r24h"

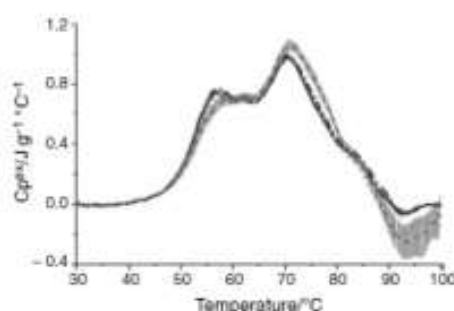


Fig. 1 Mean DSC curves of serum taken before exercise (solid black line), after exercise (dash red line), after an hour of rest (dot green line) and 24 h of rest (dash-dot black line) before WBC treatments; the shaded area is the standard error at each temperature (shown for "be" and "ae" curves). (Color figure online)

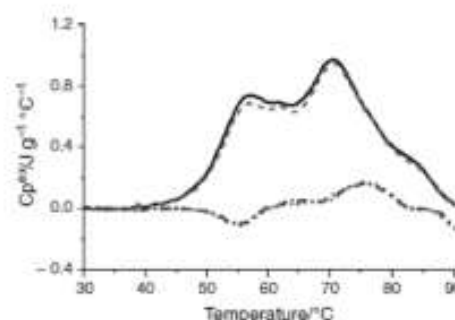


Fig. 2 Mean DSC curves of serum before exercise when the WBC was not applied (solid black line), and after a series of 10 WBC treatments (dash green line); differences between post-exercise and before-exercise curves when the WBC was not applied (dash-dot blue line). (Color figure online)

Table 3 Mean ($\pm$ SD) values of thermodynamic parameters in subsequent stages of the training cycle conducted without WBC treatments: before and after the exercise, after 1 h and 24 h of rest

Parameter	Without WBC treatments			
	be	ae	r1 h	r24 h
$T_f/^\circ\text{C}$	56.74 $\pm$ 1.23	58.05 $\pm$ 1.04	57.53 $\pm$ 1.33	56.93 $\pm$ 0.82
$\text{Cp}_2/\text{J g}^{-1} ^\circ\text{C}^{-1}$	0.767 $\pm$ 0.078	0.704 $\pm$ 0.079	0.750 $\pm$ 0.105	0.779 $\pm$ 0.079
$T_f/^\circ\text{C}$	61.82 $\pm$ 0.61	62.01 $\pm$ 0.54	61.85 $\pm$ 0.72	61.89 $\pm$ 0.66
$\text{Cp}_2/\text{J g}^{-1} ^\circ\text{C}^{-1}$	0.700 $\pm$ 0.067	0.721 $\pm$ 0.075	0.700 $\pm$ 0.079	0.729 $\pm$ 0.067
$T_f/^\circ\text{C}$	70.56 $\pm$ 0.23	71.11 $\pm$ 0.44	70.62 $\pm$ 0.42	70.49 $\pm$ 0.21
$\text{Cp}_2/\text{J g}^{-1} ^\circ\text{C}^{-1}$	0.976 $\pm$ 0.063	1.068 $\pm$ 0.101	1.018 $\pm$ 0.079	0.997 $\pm$ 0.088
$\Delta H/\text{J g}^{-1}$	23.76 $\pm$ 1.42	24.76 $\pm$ 2.05	23.51 $\pm$ 2.35	24.47 $\pm$ 1.72
HHW/ $^\circ\text{C}$	25.4 $\pm$ 1.2	24.8 $\pm$ 1.7	24.6 $\pm$ 1.4	25.7 $\pm$ 1.7

Table 4 Mean ($\pm$ SD) values of thermodynamic parameters in subsequent stages of the training cycle conducted after 10 WBC treatments: before and after the exercise, after 1 h and 24 h of rest

Parameter	After 10 WBC treatments			
	be	ae	r1h	r24h
$T_f/^\circ\text{C}$	57.07 $\pm$ 0.61	57.66 $\pm$ 0.45	57.19 $\pm$ 0.88	57.35 $\pm$ 0.80
$\text{Cp}_2/\text{J g}^{-1} ^\circ\text{C}^{-1}$	0.696 $\pm$ 0.079	0.637 $\pm$ 0.067	0.742 $\pm$ 0.096	0.729 $\pm$ 0.054
$T_f/^\circ\text{C}$	61.89 $\pm$ 0.53	62.22 $\pm$ 0.67	61.87 $\pm$ 0.45	61.57 $\pm$ 0.37
$\text{Cp}_2/\text{J g}^{-1} ^\circ\text{C}^{-1}$	0.683 $\pm$ 0.063	0.708 $\pm$ 0.071	0.704 $\pm$ 0.059	0.696 $\pm$ 0.038
$T_f/^\circ\text{C}$	70.50 $\pm$ 0.33	71.49 $\pm$ 0.40	70.68 $\pm$ 0.44	70.47 $\pm$ 0.15
$\text{Cp}_2/\text{J g}^{-1} ^\circ\text{C}^{-1}$	0.960 $\pm$ 0.075	1.031 $\pm$ 0.071	0.989 $\pm$ 0.034	0.947 $\pm$ 0.042
$\Delta H/\text{J g}^{-1}$	22.58 $\pm$ 1.51	23.46 $\pm$ 1.22	23.63 $\pm$ 1.22	22.21 $\pm$ 0.84
HHW/ $^\circ\text{C}$	25.1 $\pm$ 1.5	24.5 $\pm$ 1.5	25.5 $\pm$ 1.5	24.8 $\pm$ 1.0

($p=0.018$) and for T_3 between "ae" and all other stages ($p<0.005$).

A parameter worth analyzing is the ratio of Cp3 to Cp1. This ratio increases significantly ($p<0.01$) after exercise in both experimental sessions, conducted before and after WBC treatments (from 1.27 to 1.52 and from 1.38 to 1.62, respectively). Then, during the recovery Cp3/Cp1 decreases and returns to the baseline value after 24 h if WBC was not applied and already after 1 h of rest if WBC was used. It seems particularly interesting that after the exercise in the training session enriched with WBC, high, statistically significant correlations occur between the Cp3/Cp1 ratio and the anthropometric parameters like: height ($r=-0.84$; $p=0.009$), skeletal muscle mass ($r=-0.8$; $p=0.018$), body fat mass/% ($r=0.79$; $p=0.02$) and body mass ($r=-0.76$; $p=0.03$). Correlations between anthropometric characteristics of athletes and the Cp3/Cp1 ratio in other stages of experiment have the same character, but they were much weaker and statistically insignificant. Such results allow to suggest the synergistic effect of exercise and whole-body cryostimulation in professional skiers. Ziemann's et al. [58] results also suggested the synergistic anti-inflammatory effect of moderate-intensity training and whole-body cryostimulation in professional athletes.

Another puzzling significant correlation (shown in Table 5) has been found between HR at the Anaerobic Threshold (HR-AT) and the Cp3/Cp1 ratio in all stages

Table 5 Pearson's correlation coefficients between HR-AT and the Cp3/Cp1 ratio in various stages of training session

	be	ae	r1h	r24h
Session without WBC treatments	-0.85 $p=0.008$	-0.81 $p=0.014$	-0.76 $p=0.03$	-0.84 $p=0.01$
Session with WBC treatments	-0.81 $p=0.015$	-0.53 $p=0.18$	-0.51 $p=0.20$	-0.67 $p=0.15$

Significant correlations ($p<0.05$) are printed in bold

of exercise session without WBC. Negative correlations indicate that higher values of HR-AT are accompanied by lower Cp3/Cp1 ratios. In the case of the session with WBC, statistically significant correlation occurs only in one stage (before exercise). We are not able reasonably interpret the found relationship.

Changes observed in the mean serum DSC profiles and trends for Cp₁, Cp₃ values suggest a decrease of albumin and an increase of gammaglobulin content after the exercise. Actually, the gammaglobulin concentration increases from 12.2 $\pm$ 0.5 g L⁻¹ before the exercise to 13.3 $\pm$ 0.9 g L⁻¹ after the exercise. This increase is on the verge of statistical significance ($p=0.05$). However, albumin's pre-exercise level is not lower than post-exercise one. It even significantly ($p=0.01$) grows from 42.2 $\pm$ 0.4 to 44.6 $\pm$ 0.4 g L⁻¹.

Considering that statistically significant increase of the level of total protein in blood serum has been observed after the exercise (from 78.6 ± 0.8 to 84.0 ± 1.4 g L⁻¹), % participation of albumin has practically remained unchanged. Thus, as a likely explanation one can suggest a reduction in the fraction of an un-liganded albumin with simultaneous increase of albumin with bound ligands (e.g. fatty acids). This fraction of albumin unfolds in higher temperature range, overlapping with that for gammaglobulins [59]. The meaningful seems to be the change of the character of correlation between the amount of serum albumin and Cp₁ from positive before the exercise ($r = 0.78$; $p = 0.04$) to negative ($r = -0.83$; $p = 0.04$) after the exercise in the training session without WBC. Physical exercise can affect the metabolite profile and the composition and content of polyunsaturated essential fatty acids in body fluids and tissues [60]. Allen et al. [61] have reported recently that exercise training alters gut microbial communities and increases functional metabolic capacity for the gut microbiota to produce short chain fatty acids (SCFA), which serve as an energy source for a variety of tissues and have been shown to reduce inflammation. These exercise-induced changes in the microbiota were largely reversed once exercise training ceased.

Although the exercise test was adjusted to participant's individual threshold intensity, the response of athletes to the effort was varied. For two men and one woman, practically no change in the DSC curves of sera after exercise was observed in the first session, i.e. without the use of WBC treatments. Thus, for a more detailed analysis, the group of athletes was divided into two subgroups. The first group consisted of athletes for whom the trends of response to effort and then rest was as it follows from the comparison of mean DSC curves illustrated in Fig. 1. The second group consisted of three skiers less responsive to the effort. For these athletes, differences between DSC curves of serum in various stages of training were hardly visible. It seems interesting to note that the woman included in this group had from the participants of the study the highest percentage of body fat (24%), and the two men the largest % of body fat (both 12.5%) among men. In Fig. 3, differences in trends of post-exercise changes observed for both groups due to the use of cryotherapy are illustrated. For the group 1, the changes in serum DSC curves caused by exercise were smaller after WBC treatments while for the group 2, differences observed in the range 50–60 °C, contrary to the group 1, increased slightly under the influence of repeated systemic cryostimulation. These differences for the group 2 remained, however, so small that it would be unreasonable to interpret them. The limitation of our study is too small number of participants to verify the hypothesis that the modification of the response of elite skiers to the effort by WBC treatments depends on the athlete's obesity status. There are

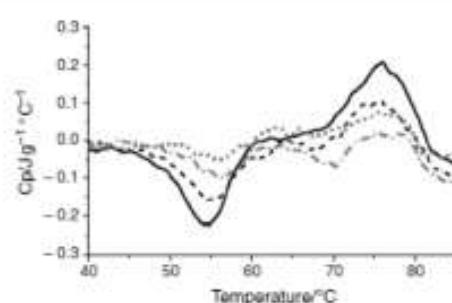


Fig. 3 Differences between post-exercise and pre-exercise mean serum DSC curves before WBC (— group 1, --- group 2) and after WBC (··· group 1, - · - group 2). (Color figure online)

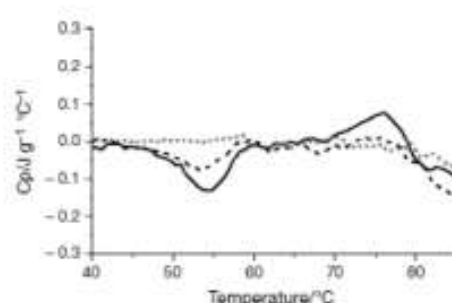


Fig. 4 Differences between "r1h" and "be" mean serum DSC curves before WBC (— group 1, --- group 2) and after WBC (··· group 1, - · - group 2). (Color figure online)

differences in metabolic reactions to the cold between lean and over-weight people. A higher concentration of body fat percentage in women than in men determines the higher females inner thermal resistance [62]. Since only 2 women participated in our study, we are unable to infer any differences with regard to the sex of the participants. It should be also noted that none of the participants was overweight. In our earlier study [63], a decrease of % fat content after 10 WBC was found but mainly for participants with the low level of body fat mass.

The comparison of curves shown in Fig. 4 indicates that when whole-body cryostimulation was applied in group 1, the recovery after exercise became almost fully after 1 h of rest. The difference in the 70–80 °C temperature range has disappeared. These findings suggest that WBC applied before exercise could be used to support and accelerate the recovery process. However, to increase the strength of these promising results, it will be necessary in future studies to enlarge the group of participants.

Conclusions

This study was part of a larger project investigating effects of whole-body cryostimulation on exercise responses, recovery and the control of the inflammatory process after exercise in elite athletes, cellular functions, which are the basis of optimized performance of organs and the entire organism, and regulation of metabolic and hormonal pathways.

Differential scanning calorimetry was applied to evaluate the effect of WBC on the response of elite cross-country skiers to the exhaustive exercise and the recovery of athletic performance following exercise. Reflected in mean DSC curves differences among serum samples collected in four stages: before exercise, after exercise, after 1 h of rest and after 24 h of rest have been found of a similar nature regardless of the WBC. However, a diversity in the individual response both to the effort and cryostimulation has been observed. In most cases, the effect of fatigue was clearly reflected in thermal properties of blood serum. The application of WBC in these well-trained cross-country skiers modified their response to physical effort and enhanced post-exercise recovery. After completing a total of ten whole-body cryostimulation sessions, the intensity of the effort response has been reduced for the majority of athletes from the studied group. Too small group of elite athletes in our study did not allow to confirm statistically significant effect of WBC on exercise-induced changes in blood serum and on post-exercise recovery.

Funding The project has been financed by the grant Ministry of Science and Higher Education/Nr 0050/R54/2016/54.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Lombardi G, Ziemann E, Banfi G. Whole-body cryotherapy in athletes: from therapy to stimulation. An updated review of the literature. *Front Physiol*. 2017. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00258>.
- Lubkowska A, Banfi G, Dolegowska B, d'Eril GV, Luczak J, Barrasi A. Changes in lipid profile in response to three different protocols of whole-body cryostimulation treatments. *Cryobiology*. 2010;61(1):22–6.
- Lubkowska A, Dudzińska W, Bryczkowska I, Dolegowska B. Body composition, lipid profile, adipokine concentration, and antioxidant capacity changes during interventions to treat overweight with exercise programme and whole-body cryostimulation. *Oxidative Med Cell Longev*. 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/983197>.
- Banfi G, Melegati G, Barassi A, Dogliotti G, d'Eril GM, Dugué B, et al. Effects of whole-body cryotherapy on serum mediators of inflammation and serum muscle enzymes in athletes. *J Therm Biol*. 2009;34:55–9.
- Hauswirth C. The effects of whole-body cryotherapy exposure in sport: applications for recovery and performance. (2015). <https://pdfs.semanticscholar.org/6523/16df7bc920a8b647c7834f7a1beb50dd7183.pdf>. Accessed Jan 2019.
- Schaal K, Le Meur Y, Louis J, Fillard JR, Hellard P, Casazza G, Hauswirth C. Whole-body cryostimulation limits overreaching in elite synchronized swimmers. *Med Sci Sports Exerc*. 2015;47:1416–25.
- Bouzigon R, Ravier G, Dugué B, et al. The use of whole-body cryostimulation to improve the quality of sleep in athletes during high level standard competitions. *Br J Sports Med*. 2014;48(7):572.
- Rymaszewska J, Ramsey D, Chładzińska-Kiejna S. Whole-body cryotherapy as adjunct treatment of depressive and anxiety disorders. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 2008;56:63–8.
- Charkoudian N. Mechanisms and modifiers of reflex induced cutaneous vasodilation and vasoconstriction in humans. *J Appl Physiol*. 2010;109(4):1221–8.
- Manou-Stathopoulou V, Goodwin CD, Patterson T, Redwood SR, Marber MS, Williams RP. The effects of cold and exercise on the cardiovascular system. *Heart*. 2015;101:808–20.
- Stocks JM, Taylor NA, Tipton MJ, Greenleaf JE. Human physiological responses to cold exposure. *Aviat Space Environ Med*. 2004;75(5):444–57.
- Dugué B, Smolander J, Westerlund T, Oksa J, Nieminen R, Moilanen E, et al. Acute and long-term effects of winter swimming and whole-body cryotherapy on plasma antioxidative capacity in healthy women. *Scand J Clin Lab Invest*. 2005;65(5):395–402.
- Lubkowska A, Dolegowska B, Szygula Z, Klimek A. Activity of selected enzymes in erythrocytes and level of plasma antioxidants in response to single whole-body cryostimulation in humans. *Scand J Clin Lab Invest*. 2009;69:387–94.
- Lubkowska A, Szygula Z, Klimek AJ, Torii M. Do sessions of cryostimulation have influence on white blood cell count, level of IL6 and total oxidative and antioxidative status in healthy men? *Eur J Appl Physiol*. 2010;109:67–72.
- Stanek A, Sieroni-Stoltny K, Romuk E, et al. Whole-body cryostimulation as an effective method of reducing oxidative stress in healthy men. *Adv Clin Exp Med*. 2016;25:1281–91.
- Stanek A, Cholewicka A, Wielkoszyński T, Romuk E, Sieroni A. Whole-body cryotherapy decreases the levels of inflammatory, oxidative stress, and atherosclerosis plaque markers in male patients with active-phase ankylosing spondylitis in the absence of classical cardiovascular risk factors. *Handw Mediat Inflamm*. 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/8592532>.

17. Pournot H, Bieuzen F, Louis J, Mounier R, Fillard JR, Barbiche E. Time-course of changes in inflammatory response after whole-body cryotherapy multi exposures following severe exercise. *PLoS ONE*. 2011. <https://doi.org/10.1371/annotation/dadb3312-7d2b-459c-9717-a09c1ef3881>.
18. Wozniak A, Wozniak B, Drewa G, Mila-Kierzenkowska C, Rakowski A. The effect of whole-body cryostimulation on lysosomal enzyme activity in kayakers during training. *Eur J Appl Physiol*. 2007;100:137–42.
19. Ziemann E, Olek RA, Grzywacz T, Kaczor JJ, Antosiewicz J, Skrobot W, Kujach S, Laskowski R. Whole-body cryostimulation as an effective way of reducing exercise-induced inflammation and blood cholesterol in young men. *Eur Cytokine Netw*. 2014;25:14–23.
20. Fonda B, Sarabon N. Effects of whole-body cryotherapy on recovery after hamstring damaging exercise: a crossover study. *Scand J Med Sci Sports*. 2013;23:e270–8.
21. Hausswirth C, Louis J, Bieuzen F, Pournot H, Fournier J, Fillard JR, Brisswalter J. Effects of whole-body cryotherapy vs. far-infrared vs. passive modalities on recovery from exercise-induced muscle damage in highly-trained runners. *PLoS ONE*. 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027749>.
22. Mila-Kierzenkowska C, Jurecka A, Wozniak A, Szpinda M, Augustynska B, Wozniak B. The effect of submaximal exercise preceded by single whole-body cryotherapy on the markers of oxidative stress and inflammation in blood of volleyball players. *Oxidative Med Cell Longev*. 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/409567>.
23. Krueger M, Costello JT, Achtzehn S, Dittmar KH, Mester J. Whole-body cryotherapy (−110 & #xB0;C) following high-intensity intermittent exercise does not alter hormonal, inflammatory or muscle damage biomarkers in trained males. *Cytokine*. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.cyt.2018.07.018>.
24. Costello JT, Algar LA, Donnelly AE. Effects of whole-body cryotherapy (−110 & #xB0;C) on proprioception and indices of muscle damage. *Scand J Med Sci Sports*. 2012;22:190–8.
25. Vieira A, Bottaro M, Ferreira-Junior JB, Vieira C, Cleto VA, Cadore EL, Simoes HG, Carmo JD, Brown LE. Does whole-body cryotherapy improve vertical jump recovery following a high-intensity exercise bout? *Open Access J Sports Med*. 2015;6:49–54.
26. Wilson LJ, Cockburn E, Paice K, Sinclair S, Faki T, Hills FA, Gondek MB, Wood A, Dimitriou L. Recovery following a marathon: a comparison of cold water immersion, whole body cryotherapy and a placebo control. *Eur J Appl Physiol*. 2018;118(1):153–63.
27. Costello JT, Baker PRA, Minett GM, Bieuzen F, Stewart IB, Bleakley C. Whole-body cryotherapy (extreme cold air exposure) for preventing and treating muscle soreness after exercise in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015;9:CD010789. <https://doi.org/10.1002/14651858.cd010789.pub2>.
28. Dupuy O, Douzi W, Theurot D, Bosquet L, Dugué B. An evidence-based approach for choosing post-exercise recovery techniques to reduce markers of muscle damage, soreness, fatigue, and inflammation: a systematic review with meta-analysis. *Front Physiol*. 2018. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00403>.
29. Kruger M, de Moraes M, Dittmar KH, Sperlich B, Mester J. Whole-body cryotherapy's enhancement of acute recovery of running performance in well-trained athletes. *Int J Sports Physiol Perform*. 2015;10:605–12.
30. Minett GM, Costello JT. Specificity and context in post-exercise recovery: it is not a one-size-fits-all approach. *Front Physiol*. 2015. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00130>.
31. Dufour SP, Lampert E, Doutreleau S, Lonsdorfer-Wolf E, Billat VL, Piquard F, Richard R. Eccentric cycle exercise: training application of specific circulatory adjustments. *Med Sci Sports Exerc*. 2014;36(11):1900–6.
32. Perrey S, Betik A, Candau R, Rouillon JD, Hughson RI. Comparison of oxygen uptake kinetics during concentric and eccentric cycle exercise. *J Appl Physiol*. 2001;91(5):2135–42.
33. Pokora I, Grucza R. Reakcje termoregulacyjne podczas koncentrycznego, ekscentrycznego i mieszanego wysiłku biegowego. *Medicina Sportiva Practica*. 2007;8(4):107–10.
34. McCully KK, Faulkner JA. Characteristics of lengthening contractions associated with injury to skeletal muscle fibers. *J Appl Physiol*. 1986;61(1):293–9.
35. Sorichter S, Martin M, Julius P, Schwirtz A, Huonker M, Luttman W, Waltersperger S, Berg A. Effects of unaccustomed and accustomed exercise on the immune response in runners. *Med Sci Sports Exerc*. 2006;38:1739–45.
36. Pokora I, Kempa K, Chrapusta SJ, Langfort J. Effects of downhill and uphill exercises of equivalent submaximal intensities on selected blood cytokine levels and blood creatine kinase activity. *Biol Sport*. 2014;31(3):173–8.
37. Garbett NC, Miller JJ, Jensen AB, Chaires JB. Calorimetry outside the box: a new window into the plasma proteome. *Biophys J*. 2008;94:1377–83.
38. Garbett NC, Mekmaysy CS, Helm W, Jensen AB, Chaires JB. Differential scanning calorimetry of blood plasma for clinical diagnosis and monitoring. *Exp Mol Pathol*. 2009;86:186–91.
39. Michnik A, Drzazga Z, Michalik K, Barczyk A, Santura I, Sozańska E, Pierzchała W. Differential scanning calorimetry study of blood serum in chronic obstructive pulmonary disease. *J Therm Anal Calorim*. 2010;102:57–60.
40. Todinova S, Krumova S, Gancheva L, Roberts Ch, Taneva SG. Microcalorimetry of blood serum proteome: a modified interaction network in the multiple myeloma case. *Anal Chem*. 2011;83:7992–8.
41. Zapf I, Fekets T, Ferencz A, Tizedes G, Pavlovics G, Kálmán E, Lőrinczy D. DSC analysis of human plasma in breast cancer patients. *Thermochim Acta*. 2011;524:88–91.
42. Fekets T, Zapf I, Ferencz A, Lőrinczy D. Differential scanning calorimetry (DSC) analysis of human plasma in melanoma patients with or without regional lymph node metastases. *J Therm Anal Calorim*. 2012;108:149–52.
43. Todinova SJ, Krumova SB, Kurtev P, Dimitrov V, Djongov L, Dudunkov Z, Taneva SG. Calorimetry-based profiling of blood plasma from colorectal cancer patients. *Biochim Biophys Acta*. 2012;820:1879–85.
44. Moezzi M, Fekets T, Zapf I, Ferencz A, Lőrinczy D. Differential scanning calorimetry (DSC) analysis of human plasma in different psoriasis stages. *J Therm Anal Calorim*. 2013;111:1801–4.
45. Garbett NC, Merchant ML, Helm CW, Jensen AB, Klein JB, Chaires JB. Detection of cervical cancer biomarker patterns in blood plasma and urine by differential scanning calorimetry and mass spectrometry. *PLoS ONE*. 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084710>.
46. Todinova S, Krumova S, Radoeva R, Gancheva L, Taneva SG. Calorimetric markers of Bence Jones and nonsecretory multiple myeloma serum proteome. *Anal Chem*. 2014;86:12355–61.
47. Garbett NC, Mekmaysy CS, DeLoeuw L, Chaires JB. Clinical application of plasma thermograms. Utility, practical approaches and considerations. *Methods*. 2015;76:41–50.
48. Barceló F, Cerdà JJ, Gutiérrez A, Jiménez-Marco T, Durán MA, Novo A, et al. Characterization of monoclonal gammopathy of undetermined significance by calorimetric analysis of blood serum proteome. *PLoS ONE*. 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120316>.
49. Zapf I, Moezzi MM, Fekets T, Nedvig K, Lőrinczy D, Ferencz A. Influence of oxidative injury and monitoring of blood

- plasma by DSC on breast cancer patients. *J Therm Anal Calorim.* 2016;123:2029–35.
50. Nemsadze GS, Lezhava TA, Gorgoshidze MZ, Kiladze M, Gogelia N, Khachidze D, Lomidze E, Monaseldze J. Blood plasma main proteins stability of patients with ductal carcinoma in postsurgery period. *Int J Clin Exp Med.* 2016;9:1338–45.
 51. Ferencz A, Lorinczy D. DSC measurements of blood plasma on patients with chronic pancreatitis and operable and inoperable pancreatic adenocarcinoma. *J Therm Anal Calorim.* 2017;127:1187–92.
 52. Wiegand N, Bücs G, Dandé LD. Investigation of protein content of synovial fluids with DSC in different arthritides. *J Therm Anal Calorim.* 2019. <https://doi.org/10.1007/s10973-019-08151-6>.
 53. Michnik A, Drzazga Z, Poprzęcki S, Czuba M, Kempa K, Sadowska-Krepa E. DSC serum profiles of sportsmen. *J Therm Anal Calorim.* 2013;113:365–70.
 54. Michnik A, Sadowska-Krepa E, Domaszewski P, Duch K, Pokora I. Blood serum DSC analysis of well-trained men response to CrossFit training and green tea extract supplementation. *J Therm Anal Calorim.* 2017;130:1253–62.
 55. Michnik A, Drzazga Z, Schisler I, Poprzęcki S, Czuba M. Diversity in athlete's response to strength effort in normobaric hypoxia. Serum DSC study. *J Therm Anal Calorim.* 2018;134:633–41.
 56. Czuba M, Maszczyk A, Gerasimuk D, Rocznik R, Fidos-Czuba O, Zając A, Golaś A, Mostowik A, Langfort J. The effects of hypobaric hypoxia on erythropoiesis, maximal oxygen uptake and energy cost of exercise under normoxia in elite biathletes. *J Sports Sci Med.* 2014;13(4):912–20.
 57. Cheng B, Kuipers H, Snyder AC, Keizer HA, Jeukendrup A, Hesselink M. A new approach for the determination of ventilatory and lactate thresholds. *Int J Sports Med.* 1992;13(7):518–22.
 58. Ziemann E, Olek RA, Kajach S, Grzywacz T, Antosiewicz J, Garszka T, Laskowski R. Five-day whole-body cryostimulation, blood inflammatory markers, and performance in high-ranking professional tennis players. *J Athletic Train.* 2012;47(6):664–72.
 59. Michnik A, Drzazga Z. Thermal denaturation of mixtures of human serum proteins—DSC study. *J Therm Anal Calorim.* 2010;101:513–8.
 60. Chorell E, Svensson MB, Moritz T, Antti H. Physical fitness level is reflected by alterations in the human plasma metabolome. *Mol Biosyst.* 2012;8(4):1187–96.
 61. Allen JM, Mailing LJ, Niemi GM, Moore R, Cook MD, White BA, Holscher HD, Woods JA. Exercise alters gut microbiota composition and function in lean and obese humans. *Med Sci Sports Exerc.* 2018;50(4):747–57.
 62. Polidori G, Cuttelli S, Hammond L, Langdon D, Legrand F, Taisir R, Boyer FC, Costello JT. Should whole body cryotherapy sessions be differentiated between women and men? A preliminary study on the role of the body thermal resistance. *Med Hypotheses.* 2018;120:60–4.
 63. Duch K, Michnik A, Pokora I, Sadowska-Krepa E, Kielbaso A. Whole-body cryostimulation impact on blood serum thermal denaturation profiles of cross-country skiers. *J Therm Anal Calorim.* 2019. <https://doi.org/10.1007/s10973-019-08766-9>.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Anna Michnik

Chorzów, 01.06.2022

Instytut Fizyki, Uniwersytet Śląski

ul. 75 Pułku Piechoty 1a, 41-500 Chorzów

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Michnik A, Pokora I, Duch K, Sadowska-Krępa E, *Differential scanning calorimetry reveals that whole-body cryostimulation in cross-country skiers can modify their response to physical effort*, in: *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, vol. 143, Springer International Publishing, DOI 10.1007/s10973-020-09285-8, Print ISSN 1388-6150, Electronic ISSN 1588-2926, 2021, pp 255–264 mój udział polegał na: stworzenia koncepcji publikacji, nadzorowaniu badań DSC, czynnym udziale w opracowaniu i analizie wyników, napisaniu i edycji manuskryptu.


.....
Podpis

Iłona Pokora

Chorzów, 01.06.2022

Zakład Fizjologii, Katedra Nauk Fizjologicznych i Medycznych

Akademia Wychowania Fizycznego im. J. Kukuczki

ul. Mikołowska 72a, 40-065 Katowice

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Michnik A, Pokora I, Duch K, Sadowska-Krępa E, *Differential scanning calorimetry reveals that whole-body cryostimulation in cross-country skiers can modify their response to physical effort*, in: *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, vol. 143, Springer International Publishing, DOI 10.1007/s10973-020-09285-8, Print ISSN 1388-6150, Electronic ISSN 1588-2926, 2021, pp 255–264 mój udział polegał na: stworzeniu koncepcji projektu badawczego, organizacji badań, w tym rekrutacji uczestników oraz nadzorze nad prowadzonymi badaniami i czynnym udziale w pisaniu i edycji manuskryptu.



Podpis

Ewa Sadowska-Krępa

Chorzów, 01.06.2022

Katedra Nauk Fizjologicznych i Medycznych

Akademia Wychowania Fizycznego im. J. Kukuczki

ul. Mikołowska 72a, 40-065 Katowice

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Michnik A, Pokora I, Duch K, Sadowska-Krępa E, *Differential scanning calorimetry reveals that whole-body cryostimulation in cross-country skiers can modify their response to physical effort*, in: Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, vol. 143, Springer International Publishing, DOI 10.1007/s10973-020-09285-8, Print ISSN 1388-6150, Electronic ISSN 1588-2926, 2021, pp 255–264 mój udział polegał na: nadzorze nad prowadzonymi badaniami biochemicznymi, czynnym udziale w analizie badań biochemicznych, czynnym udziale w pisaniu i edycji manuskryptu.


.....
Podpis

5.4. Duch K, Michnik A, Pokora I, Sadowska-Krępa E. Modification of blood serum DSC profiles by sauna treatments in cross-country skiers during the exercise cycle. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry (2020, 142, 1927–1932), doi 10.1007/s10973-020-10162-7

Impact Factor czasopisma: 4.626.

Liczba punktów ministerialnych MEiN: 100 pkt.

DOI: 10.1007/s10973-020-10162-7

Mój udział w załączonym artykule polegał na: wykonaniu pomiarów DSC, opracowaniu, analizie i dyskusji wyników, czynnym udziale w pisaniu i edycji manuskryptu.

Wkład pozostałych współautorów, w formie oświadczeń, zamieszczono na końcu artykułu.



Modification of blood serum DSC profiles by sauna treatments in cross-country skiers during the exercise cycle

Klaudia Duch¹ · Anna Michnik¹ · Ilona Pokora² · Ewa Sadowska-Krępa²

Received: 9 January 2020 / Accepted: 4 August 2020 / Published online: 18 August 2020
© The Author(s) 2020

Abstract

The study has evaluated the effect of sauna treatments on the blood serum of professional cross-country skiers (3 women and 6 men) during two exercise sessions: the first without any treatments and the second after ten sauna treatments. Aqueous solutions of serum samples from the blood of athletes collected in four stages in both exercise sessions: at rest, after exercise, after 1 h and 24 h rest and additionally only at rest after the first sauna treatment, were measured by means of differential scanning calorimetry (DSC). DSC results allowed to register characteristic post-exercise changes in the profile of thermal denaturation transition of serum. A trend of these changes was similar regardless of the use of sauna, but their intensity was stronger in the exercise session after the sauna treatments. In particular, the differences relating to the use of sauna have revealed in the higher temperature range of serum denaturation transition. Regarding the recovery process after exercises, a large individual variability was observed in both sessions.

Keywords Cross-country skiers · DSC · Human blood serum · Protein thermal denaturation · Finnish sauna treatments

Introduction

Sauna is a physical treatment, originating from Scandinavian countries such as Finland, and now widely used throughout the world [1–3]. Sauna treatments are used very often in sports medicine in rehabilitation and recreation or biological regeneration due to its positive effect on the body of athletes [1–12]. It has been shown that sauna treatments positively influence the hemodynamics of blood pressure and pulse [1, 2, 10], stimulate athletes' immune system [4], help to maintain adaptive changes to physical effort [6, 7], favorably modulate heart rate variability [8], support circulation [9, 11], improve sleep [9], improve mental health [9, 11], increase "body detoxification" [9], relieve back and musculoskeletal pain [9], probably reduce the risk of sudden

cardiac death [11], improve lipid profile [12]. In some studies, there were no positive effects of the use of sauna treatments [5, 13, 14]. It is important to prevent any misuse of the sauna [3, 14].

Differential scanning calorimetry (DSC) has found wide application in medical and biological sciences [15–34]. Attempts to use the DSC method for clinical purposes have been made for several years [15–27]. DSC profiles of blood serum, plasma, synovial fluid, cerebrospinal fluid are very useful because they can be a valuable source of information about alterations in these physiological fluids caused by different diseases or treatments. DSC seems to be a very informative technique also in sports medicine [28–32].

In this paper, DSC has been employed to detect changes in the thermal behavior of blood serum solutions due to sauna treatments. The effect of one sauna treatment and a series of 10 sauna treatments on endothermic denaturation transition of cross-country skiers' serum has been analyzed and compared. Moreover, post-exercise changes and those in the recovery period were tracked in blood serum during two same exercise sessions, of which one was before and the other after ten sauna treatments.

Anna Michnik
anna.michnik@us.edu.pl

¹ Faculty of Science and Technology, The Silesian Centre for Education and Interdisciplinary Research, University of Silesia in Katowice, ul. 75 Pułku Piechoty 1A, 41-500 Chorzów, Poland

² Institute of Sport Sciences, The Jerzy Kukuczka Academy of Physical Education in Katowice, ul. Mikolowska 72a, 40-065 Katowice, Poland

Materials and methods

Participants

Nine athletes (3 women and 6 men) well trained in cross-country skiing participated in this study. These athletes belong to the national team and take part in competitions in many countries around the world. A study was carried out during the transition phase of the annual training plan.

All athletes were informed about the purpose and the nature of the research before giving their written consent to participate in the experiment. The studies were performed in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional and national) and with Declaration of Helsinki. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Jerzy Kukuczka Academy of Physical Education in Katowice (Certificate of approval No. 2/2016).

Experimental

The study consisted of pre-sauna (SI) and post-sauna (SII) stages. The athletes' $\dot{V}O_{2\max}$, peak HR, peak power output and HR at individual anaerobic threshold (AT) (HR-AT) were determined in the week prior to the pre-sauna period, using a graded running exercise test.

Experimental exercise test (EET) was carried out twice: before (SI) and after (SII) a series of ten sauna baths. EET test consists of ~60 min running with the intensity below the individual anaerobic threshold, on treadmill H/P/Cosmos Pulsar at 20 ± 1 °C ambient temperature, $56 \pm 3\%$ relative humidity and 985 ± 5 hPa atmospheric pressure, in Research Center for Sports, Academy of Physical Education in Katowice. More details can be found in our recently published paper [32].

Finnish sauna treatments

Participants were exposed to whole-body heating (WBH) treatment in the Finnish sauna at the Academy of Physical Education in Katowice in the afternoon after the part of daily training sessions in the transition phase. We decided to standardize the duration of sauna exposure rather than standardize the relative heat stress to minimize the potential impact on the athletes' daily life/training schedule. The exclusion criteria included acute respiratory tract disorders, hyperthyroidism or hypothyroidism, and purulent-gangrenous skin lesions. The average temperature and humidity in the sauna room were 90 ± 2 °C and $15 \pm 3\%$, respectively. A single sauna session consisted of three

WBH treatments, each lasting from 10 to 15 min, followed by breaks to cool down the body.

Blood serum samples

Venous blood samples were taken from athletes at rest: before sauna treatments, after 1 sauna treatment and after 10 sauna treatments which were held on weekdays over two weeks. Blood samples were always collected at the same time in the morning. Additionally, blood samples were collected during two exercise sessions: SI—before sauna treatments and SII—after 10 sauna treatments in 4 stages: before exercise (be), 3 min after exercise (ae), after 1 h of rest (r1h) and after 24 h rest (r24h).

Blood serum samples were prepared using the standard method and kept frozen at -20 °C until the measurement. Serum samples were thawed at room temperature for about 10 min to prepare 20-fold diluted solutions using the degassed water. The pH values of the tested aqueous serum solutions were 7.0 ± 0.5 .

DSC measurements

Differential scanning calorimetry (DSC) measurements of aqueous serum solutions were made using the VP-DSC microcalorimeter (MicroCal Co, Northampton, MA). Two scans were obtained for each sample in the temperature range 20–100 °C with a heating rate of 1 °C min^{-1} and a pressure of about $1.7 \cdot 10^5$ Pa. All raw serum DSC curves were corrected for the water–water instrumental baseline. The next steps were normalization for the gram mass of protein and subtracting the linear baseline. An apparent excess heat capacity C_p^{ex} (J °C $^{-1}$ g $^{-1}$) versus temperature (°C) has been plotted.

The following thermodynamic parameters: temperatures (T_1 , T_2 , T_3) and excess heat capacities (C_{p1} , C_{p2} , C_{p3}) of local maxima, the enthalpy (ΔH) of thermal denaturation of serum as the area under the endothermic peak, the width of peak in its half height (HHW) and the first moment of the transition with respect to the temperature axis (T_{FM}) [20, 28].

Statistical analysis

Statistical analysis was carried out with the Statistica 13.1 program. After checking for normal distribution (tested by Shapiro-Wilk test), ANOVA with repeated measurements has been used. Mauchly's test for sphericity was included as a part of the procedure. When the ANOVA results were statistically significant, the post hoc Tukey's test was performed to determine which pairs of means had significant differences. If the distribution was not normal, we used the Friedman's test. The level of statistical significance was set at $p < 0.05$.

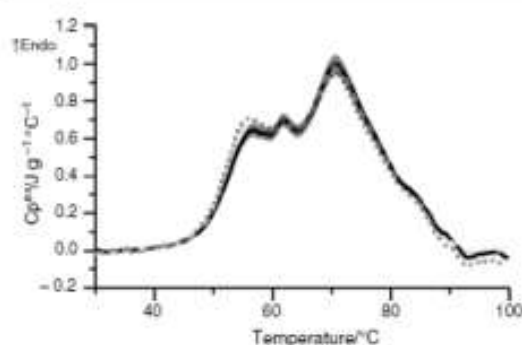


Fig. 1 Mean serum DSC curves: before sauna treatments (solid line), after 1 sauna treatment (short dash line), after series of 10 sauna treatments (short dash line); the shaded area added to the solid line is the standard error (SE) at each temperature

Results and discussion

The thermal denaturation of the proteins contained in the blood sera is observed in serum DSC profile as complex endothermic transition. At first sight, at least two or three peaks can be distinguished in this transition for healthy people, depending on the serum proteome and the solvent used [15–33]. Mean DSC curves of aqueous solutions of human blood sera samples collected from participants of our study at three time points (before sauna treatments, after 1 sauna treatment and after 10 sauna treatments) are shown in Fig. 1. All three curves are very similar to each other and slight differences between them seem to be within the limits of experimental error. The first peak at about 56 °C mainly represents the contribution of un-liganded albumin. The second sharp peak at about 62 °C comes from haptoglobin, the acute phase protein. It is not always clearly visible. The third peak at about 70 °C is derived from immunoglobulins and dominates over the less intense other two. Every of these peaks contains contributions from other serum proteins.

Average thermodynamic parameters of considered denaturation transition are listed in Table 1. In accordance with what is suggested in Fig. 1, Cp_1 and HHW values are higher while Cp_3 is slightly lower after sauna treatments. The value of T_{FM} parameter is lower after the sauna than before treatments. Surprisingly, the effect of 1 treatment seems to be stronger than 10 treatments. Particularly, statistically significant difference between T_{FM} before sauna and after 1 sauna treatment has been found ($p=0.017$ for main effect in ANOVA with repeated measure and $p=0.013$ in post hoc Tukey's test).

Figures 2 and 3 show the average serum DSC curves for four stages in exercises session SI and SII, respectively. Comparing the set of curves in both sessions, we can see

Table 1 Mean parameters (mean $\pm$ SD) of serum denaturation transition before sauna (0 sauna), after 1 sauna (1 sauna) and after 10 sauna treatments (10 sauna)

	0 sauna	1 sauna	10 sauna
$T_1/^\circ\text{C}$	56.7 ± 0.8	56.0 ± 0.7	56.5 ± 1.1
$Cp_1/J\ g^{-1}\ ^\circ\text{C}^{-1}$	0.653 ± 0.059	0.716 ± 0.063	0.703 ± 0.038
$T_2/^\circ\text{C}$	61.9 ± 0.7	62.0 ± 0.5	62.0 ± 0.6
$Cp_2/J\ g^{-1}\ ^\circ\text{C}^{-1}$	0.716 ± 0.038	0.724 ± 0.075	0.699 ± 0.050
$T_3/^\circ\text{C}$	70.8 ± 0.4	70.6 ± 0.4	70.3 ± 0.5
$Cp_3/J\ g^{-1}\ ^\circ\text{C}^{-1}$	1.000 ± 0.063	0.950 ± 0.059	0.988 ± 0.042
$\Delta H/J\ g^{-1}$	23.4 ± 1.3	23.4 ± 1.3	23.4 ± 0.4
HHW/ $^\circ\text{C}$	25.4 ± 1.0	26.6 ± 0.9	26.3 ± 0.7
$T_{FM}/^\circ\text{C}$	67.5 ± 0.6	66.7 ± 0.4	67.1 ± 0.5

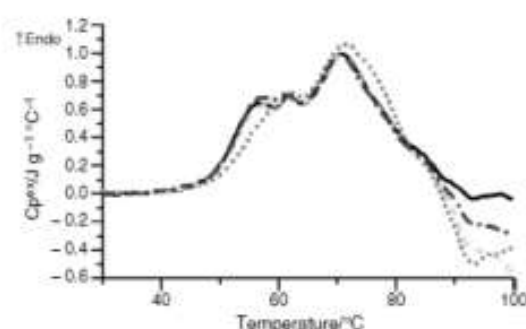


Fig. 2 Mean serum DSC curves in SI: be (solid line), ae (short dash line), r1h (short dash line), r24h (short dash dots line)

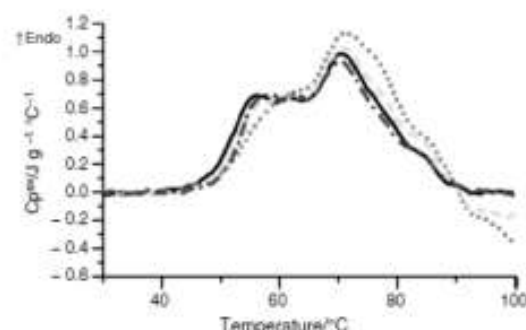


Fig. 3 Mean serum DSC curves in SII: be (solid line), ae (short dash line), r1h (short dash line), r24h (short dash dots line)

a similar trend of exercise related changes, but these in session II are more intense. In the temperature range of about 45–60 °C, we see a reduction of the first local maximum after the exercise. The excess heat capacity at the

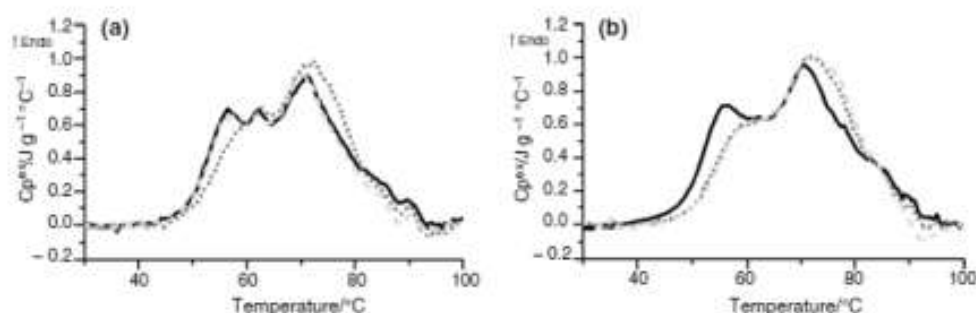


Fig. 4 The DSC curves in: be (solid line), ae (short dots line), r1h (short dash line) stages of session I (a) and II (b) for serum of the athlete whose regeneration process in session II was delayed

temperature of the first local maximum (56.7 °C in SI and 56.5 °C in SII) decreases by $0.162 \text{ J g}^{-1} \text{ °C}^{-1}$ (from 0.653 to $0.491 \text{ J g}^{-1} \text{ °C}^{-1}$) and by $0.193 \text{ J g}^{-1} \text{ °C}^{-1}$ (from 0.703 to $0.510 \text{ J g}^{-1} \text{ °C}^{-1}$) in SI and SII, respectively. This is accompanied by a marked increase in the intensity of the transition in the temperature range of about 65–85 °C. The local maximum in this temperature range shifts from 70.8 to 74.1 °C in SI and from 70.3 to 71.1 °C in SII because of the exercise done. The results of Friedman test showed statistically significant differences between the mean T_3 values in various stages for session I ($p=0.003$) and session II ($p=0.008$). The mean excess heat capacity at the temperature of the third local maximum increases due to the exercise from 1.000 to $1.070 \text{ J g}^{-1} \text{ °C}^{-1}$ (by $0.070 \text{ J g}^{-1} \text{ °C}^{-1}$) in SI and from 0.988 to $1.137 \text{ J g}^{-1} \text{ °C}^{-1}$ (by $0.149 \text{ J g}^{-1} \text{ °C}^{-1}$) in SII. The differences between pre- and post-exercise mean values of Cp_3 have been found statistically significant ($p=0.04$ and $p=0.0008$ in session I and II, respectively). Presented results suggest that post-exercise changes in serum proteome are stronger after a series of 10 sauna treatments.

In the regeneration phase, the return to the initial shape has been observed for the denaturation transition of serum.

A comparison of Figs. 2 and 3 suggests that after an hour of rest the post-exercise modifications disappear in SII only partially, while in SI practically completely. Additionally, a slight shift of the first local maximum to higher temperature can be observed after an hour as well as a day of rest. Moreover, the exothermic aggregation effect (stronger in session I than in session II), disappearing during recovery period, is well visible in the temperature range above 85 °C.

One possible explanation of the reduction of the first local maximum may be a decrease of ligand-free albumin fraction due to attaching ligands to albumin molecules. Albumin with bound ligands denatures at higher temperatures. Albumin binds many substances such as vitamins, metabolites, dyes and drugs [35–41]. Exercises can increase the binding of various ligands by albumin, especially when they were performed after a series of sauna treatments. It is in agreement with the more intense peak in the range of 65–85 °C, which is mainly derived from immunoglobulins and liganded albumin. It is believed that exercise can play a major role in enhancing the endogenous defense system against mechanical and metabolic muscle damage, which may explain the increased contribution from immunoglobulins.

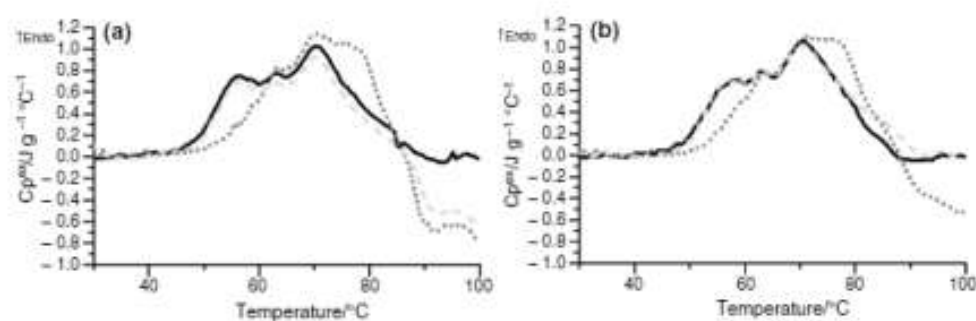


Fig. 5 The DSC curves in: be (solid line), ae (short dots line), r1h (short dash line) stages of session I (a) and session II (b) for serum of the athlete whose regeneration process took no more than an hour despite relatively large post-exercise changes in both sessions

It is known that individual metabolism is reflected in blood serum proteome modification. The data collected in this study showed that not everyone responds to the exercises in the same way and regenerates at the same time after exercise. Figures 4 and 5 show DSC curves for the athletes whose reaction was different from the one indicated by mean DSC curves presented in Figs. 2 and 3. Figure 4 presents a typical response to effort but no signs of regeneration during 1 h of rest in session II. This athlete needed more time to reverse the changes in serum caused by intense exercises performed after a series of 10 sauna treatments. Figure 5 suggests stronger than average response to exercise and despite that very fast recovery process in both sessions.

Conclusions

DSC results obtained in this study indicate that sauna treatments do not significantly modify serum denaturation transition. Although the statistically significant decrease in T_{FM} after 1 sauna treatment suggests a beneficial effect of sauna on athletes, a larger number of blood serum samples would be required for verification of this suggestion. The current DSC results did not notice gender dependence in response to sauna treatments, but only 3 women and 6 men were involved into the experiment. An important observation from our research is that the DSC method has allowed to register characteristic post-exercise changes in thermal transitions of serum denaturation. These changes are similar in nature, regardless of the use of sauna treatments before the exercise session, but enhanced by the sauna. A reduction of the first local maximum, connected mainly with the fraction of ligand-free albumin, has been observed after exercise in both sessions. Slightly larger decrease of excess heat capacity in this temperature region has occurred in the case of exercise after a series of 10 sauna treatments. The second post-exercise effect, also more intense in the exercise session after sauna treatments, was an increased intensity of the third local maximum, connected mainly with the fraction of gamma-globulins and albumin with bound ligands. So, changes in the athlete's blood serum proteome, conditioning the modification of serum DSC profiles in the session held after sauna treatments, seem to be stronger than those in the session not preceded by treatments. Comparison of sera DSC profiles indicates a diverse recovery process among athletes, especially in the post-sauna exercise session.

Funding The project has been financed by the Grant Ministry of Science and Higher Education/Nr 0050/RS4/2016/54.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

1. Hannuksela ML, Ellahham S. Benefits and risks of sauna bathing. *Am J Med*. 2001;110:118–26.
2. Prystupa T, Wołyńska A, Słczyński J. The effects of finish sauna on hemodynamics of the circulatory system in men and women. *J Hum Kinet*. 2009;22:61–8.
3. Kauppinen K. Facts and fables about sauna. *Ann N Y Acad Sci*. 1997;813:654–62.
4. Pilch W, Pokora I, Szygula Z, Palka T, Pilch P, Cison T, Malik L, Wiecha S. Effect of a single Finnish sauna session on white blood cell profile and cortisol levels in athletes and non-athletes. *J Hum Kinet*. 2013;39:127–35.
5. Hussain J, Cohen M. Clinical effects of regular dry sauna bathing: a systematic review. *Hindawi Evid Based Complement Altern Med*. 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/1857413>.
6. Zychowska M. Changes in expression of selected cellular stress response genes after passive body overheating in sauna and moderate exercise in judo athletes and untrained people. *Arch BudoSci Martial Art Extreme Sport*. 2017;13:71–8.
7. Iguchi M, Littmann AE, Chang SH, Wester LA, Knipper JS, Shields RK. Heat stress and cardiovascular, hormonal, and heat shock proteins in humans. *JAT*. 2012;47(2):184–90.
8. Laakkonen T, Lipponen J, Kunutsor SK, Zaccardi F, Aratijo CGS, Mäkelä TH, Khan H, Willeit P, Lee E, Poikonen S, Tarvainen M, Laakkonen AJ. Recovery from sauna bathing favorably modulates cardiac autonomic nervous system. *Complement Ther Med*. 2019;45:190–7.
9. Hussain JN, Greaves RF, Cohen MM. A hot topic for health: results of the global sauna survey. *Complement Ther Med*. 2019;44:223–34.
10. Ketelhut S, Ketelhut RG. The blood pressure and heart rate during sauna bath correspond to cardiac responses during submaximal dynamic exercise. *Complement Ther Med*. 2019;44:218–22.
11. Laakkonen AJ, Kunutsor SK. Is sauna bathing protective of sudden cardiac death? A review of the evidence. *Prog Cardiovasc Dis*. 2019;62:288–93.
12. Gryka D, Pilch W, Szarek M, Szygula Z, Tota Ł. The effect of sauna bathing on lipid profile in young, physically active, male subjects. *UOMEH*. 2014;27(4):608–18.
13. Podstawski R, Boryśński K, Clark CCT, Choszcz D, Finn KJ, Gronek P. Correlations between repeated use of dry sauna for 4×10 minutes, physiological parameters, anthropometric features, and body composition in young sedentary and overweight men.

- health implications. *Hindawi BioMed Res Int*. 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/7535140>.
14. Kenttämies A, Karkola K. Death in sauna. *J Forensic Sci*. 2008;53:724–9.
 15. Garbett NC, Miller JJ, Jensen AB, Chaires JB. Calorimetry outside the box: a new window into the plasma proteome. *Biophys J*. 2008;94:1377–83.
 16. Velazquez-Campoy A, Vega S, Sanchez-Gracia O, Lanás A, Rodrigo A, Kaliappan A, Hall MB, Nguyen TQ, Brock GN, Chesney JA, Garbett NC, Abian O. Thermal liquid biopsy for monitoring melanoma patients under surveillance during treatment: a pilot study. *BBA Gen Subj*. 2018;1862:1701–10.
 17. Garbett NC, Mekmayssy CS, Helm CW, Jensen AB, Chaires JB. Differential scanning calorimetry of blood plasma for clinical diagnosis and monitoring. *Exp Mol Pathol*. 2009;86:186–91.
 18. Garbett NC, Brock GN. Differential scanning calorimetry as a complementary diagnostic tool for the evaluation of biological samples. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2016;1860:981–9.
 19. Todinova S, Krumova S, Danailova A, Petkova V, Goenova M, Mihaylov G, Gancheva L, Taneva SG. Calorimetric markers for monitoring of multiple myeloma and Waldenström's macroglobulinemia patients. *Eur Biophys J*. 2018;47:549–59.
 20. Michnik A, Drzazga Z, Michalik K, Barczyk A, Santura I, Sozańska E, Pierzchała W. Differential scanning calorimetry study of blood serum in chronic obstructive pulmonary disease. *J Therm Anal Calorim*. 2010;102:57–60.
 21. Michnik A, Sadowska-Krepa E, Cholewa J, Schisler I, Kielbaso A, Drzazga Z. Differential scanning calorimetry study of early and advanced stages in Parkinson's disease using human blood serum. *Thermochimica Acta*. 2018;662:64–8.
 22. Kędra-Królik K, Chmielewska I, Michnik A, Zarzycki P. Blood serum calorimetry indicates the chemotherapeutic efficacy in lung cancer treatment. *Sci Rep*. 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17004-x>.
 23. Zapf I, Fekacs T, Ferencz A, Tizedes G, Pavlovics G, Kalman E, Lőrinczy D. DSC analysis of human plasma in breast cancer patients. *Thermochimica Acta*. 2011;524:88–91.
 24. Fekacs T, Zapf I, Ferencz A, Lőrinczy D. Differential scanning calorimetry (DSC) analysis of human plasma in melanoma patients with or without regional lymph node metastases. *J Therm Anal Calorim*. 2012;108:149–52.
 25. Parkas P, Kőnczöl F, Lőrinczy D. New possibilities of application of DSC as a new clinical diagnostic method. *J Therm Anal Calorim*. 2018;133:579–89.
 26. Dinarelli S, Longo G, Krumova S, Todinova S, Danailova A, Taneva SG, Lenzi E, Musi V, Girasole M. Insights into the morphological pattern of erythrocytes' aging: coupling quantitative AFM data to microcalorimetry and Raman spectroscopy. *J Mol Recognit*. 2018. <https://doi.org/10.1002/jmr.2732>.
 27. Rai SN, Srivastava S, Pan J, Wu X, Rai SP, Mekmayssy CS, DeLeeuw L, Chaires JB, Garbett NC. Multi-group diagnostic classification of high-dimensional data using differential scanning calorimetry plasma thermograms. *PLoS ONE*. 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220765>.
 28. Michnik A, Drzazga Z, Poprzęcki S, Czuba M, Kempa K, Sadowska-Krepa E. DSC serum profiles of sportsmen. *J Therm Anal Calorim*. 2013;113:365–70.
 29. Michnik A, Sadowska-Krepa E, Domaszewski P, Duch K, Pokora I. Blood serum DSC analysis of well-trained men response to CrossFit training and green tea extract supplementation. *J Therm Anal Calorim*. 2017;130:1253–62.
 30. Michnik A, Drzazga Z, Schisler I, Poprzęcki S, Czuba M. Diversity in athlete's response to strength effort in normobaric hypoxia. *J Therm Anal Calorim*. 2018;134:633–41.
 31. Duch K, Michnik A, Pokora I, Sadowska-Krepa E, Kielbaso A. Whole-body cryostimulation impact on blood serum thermal denaturation profiles of cross-country skiers. *J Therm Anal Calorim*. 2019. <https://doi.org/10.1007/s10973-019-08766-9>.
 32. Michnik A, Pokora I, Duch K, Sadowska-Krepa E. Differential scanning calorimetry reveals that whole-body cryostimulation in cross-country skiers can modify their response to physical effort. *J Therm Anal Calorim*. 2020. <https://doi.org/10.1007/s10973-020-09285-8>.
 33. Kielbaso A, Michnik A, Polaczek-Grelík K, Duch K, Sadowska-Krepa E. Differential scanning calorimetry of human blood serum exposed in vitro to X-ray radiation. *Thermochimica Acta*. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2019.178358>.
 34. Maróti P, Kocsis B, Ferencz A, Nyitrai M, Lőrinczy D. Differential thermal analysis of the antibacterial effect of PLA-based materials planned for 3D printing. *J Therm Anal Calorim*. 2019. <https://doi.org/10.1007/s10973-019-08377-4>.
 35. Valerio C, Theodoridou E, Davenport A, Agarwal B. Human albumin solution for patients with cirrhosis and acute on chronic liver failure: beyond simple volume expansion. *World J Hepatol*. 2016;8(7):345–54.
 36. Yang F, Zhang Y, Liang H. Interactive association of drugs binding to human serum albumin. *Int J Mol Sci*. 2014;15(3):3580–95.
 37. Lambrianidis G, Valfianatos T, Tsantili-Kakoulidou A. In vitro, in silico and integrated strategies for the estimation of plasma protein binding. A review. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015;86:27–45.
 38. Bohnert T, Gan LS. Plasma protein binding: from discovery to development. *J Pharm Sci*. 2013;102:2953–94.
 39. Lee P, Wu X. Review: modifications of human serum albumin and their binding effect. *Curr Pharm Des*. 2015;21(14):1862–5.
 40. Anraku M, Shintomo R, Taguchi K, Kragh-Hansen U, Kai T, Maruyama T, Otagiri M. Amino acids of importance for the antioxidant activity of human serum albumin as revealed by recombinant mutants and genetic variants. *Life Sci*. 2015;134:36–41.
 41. Roche M, Rondeau P, Singh NR, Tarnus E, Bourdon E. The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett*. 2008;582(13):1783–7.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Anna Michnik

Chorzów, 01.06.2022

Instytut Fizyki, Uniwersytet Śląski

ul. 75 Pułku Piechoty 1a, 41-500 Chorzów

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Duch K., Michnik A., Pokora I., Sadowska-Krępa E., *Modification of blood serum DSC profiles by sauna treatments in cross-country skiers during the exercise cycle*, in: *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, vol. 142, Springer International Publishing, DOI 10.1007/s10973-020-10162-7, Print ISSN 1388-6150, Electronic ISSN 1588-2926, 2021, pp 1927–1932 mój udział polegał na: nadzorowaniu badań DSC, czynnym udziale w opracowaniu i analizie wyników, czynnym udziale w napisaniu i edycji manuskryptu.


.....
Podpis

Ilona Pokora

Chorzów, 01.06.2022

Zakład Fizjologii, Katedra Nauk Fizjologicznych i Medycznych

Akademia Wychowania Fizycznego im. J. Kukuczki

ul. Mikołowska 72a, 40-065 Katowice

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Duch K, Michnik A, Pokora I, Sadowska-Krępa E, *Modification of blood serum DSC profiles by sauna treatments in cross-country skiers during the exercise cycle*, in: *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, vol. 142, Springer International Publishing, DOI 10.1007/s10973-020-10162-7, Print ISSN 1388-6150, Electronic ISSN 1588-2926, 2021, pp 1927–1932 mój udział polegał na: stworzeniu koncepcji projektu badawczego, organizacji badań, w tym rekrutacji uczestników oraz nadzorze nad prowadzonymi badaniami i czynnym udziale w pisaniu i edycji manuskryptu.



Podpis

Ewa Sadowska-Krępa

Chorzów, 01.06.2022

Katedra Nauk Fizjologicznych i Medycznych

Akademia Wychowania Fizycznego im. J. Kukuczki

ul. Mikołowska 72a, 40-065 Katowice

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Duch K., Michnik A., Pokora I., Sadowska-Krępa E., *Modification of blood serum DSC profiles by sauna treatments in cross-country skiers during the exercise cycle*, in: *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, vol. 142, Springer International Publishing, DOI 10.1007/s10973-020-10162-7, Print ISSN 1388-6150, Electronic ISSN 1588-2926, 2021, pp 1927–1932 mój udział polegał na: nadzorze nad prowadzonymi badaniami biochemicznymi, czynnym udziale w analizie badań biochemicznych, czynnym udziale w pisaniu i edycji manuskryptu.


.....
Podpis

5.5. Michnik A, Duch K, Pokora I, Sadowska-Krępa E. Differences in cryostimulation and sauna effects on post-exercise changes in blood serum of athletes. Complementary Therapies in Medicine (2020; 51), doi 10.1016/j.ctim.2020.102453

Impact Factor czasopisma: 2.446.

Liczba punktów ministerialnych MEiN: 100 pkt.

DOI: 10.1016/j.ctim.2020.102453

Mój udział w załączonym artykule polegał na: wykonaniu pomiarów DSC, czynnym udziale w opracowaniu i analizie wyników, czynnym udziale w edycji manuskryptu.

Wkład pozostałych współautorów, w formie oświadczeń, zamieszczono na końcu artykułu.



Differences in cryostimulation and sauna effects on post-exercise changes in blood serum of athletes

Anna Michnik^{a,*}, Klaudia Duch^a, Ilona Pokora^b, Ewa Sadowska Krępa^b

^a University of Silesia in Katowice, Faculty of Science and Technology, The Silesian Centre for Education and Interdisciplinary Research, UL 75 Półna Piekary 1A, 41-500 Chorzów, Poland

^b The Jerzy Kukuczka Academy of Physical Education in Katowice, Institute of Sport Sciences, UL Mikołowska 72a, 40-065 Katowice, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:
Differential scanning calorimetry (DSC)
Exercise
Human blood serum
Sauna
Whole-body cryostimulation

ABSTRACT

Objective: There is a growing body of evidence supporting the role of whole-body cryostimulation (WBC) and sauna – bathing as treatments for relaxation, mental well-being and several health problems. Despite their polar opposite temperatures, both of these treatments come with a dose of similar health benefits. This study is designed to compare effects of WBC and sauna application on the athletes' response to exercise.

Design: The blood samples were collected from 10 professional cross-country skiers at four stages: before exercise, after exercise, at 1-h recovery and after 24 h of rest in sessions before and after 10 thermal treatments. Differential scanning calorimetry (DSC) was used to examine the process of serum denaturation. The parameters of endothermic transition were compared at various stages of each exercise session.

Results: Post-exercise changes in DSC profiles of athlete's blood serum are similar in character but clearly stronger in the session held after sauna treatments and slightly weaker after WBC than those in the session not preceded by treatments. These changes can be, at least in part, explained by the exercise induced increase in the concentration of oxidized albumin. A return of serum denaturation transition to pre-exercise shape has been observed within a few hours of rest. It suggests relatively quick restoration of a fraction of non-oxidized albumin molecules during the recovery period.

Conclusion: An exercise performed by athletes after a series of sauna treatments leads to temporary greater modification of the blood serum proteome than the similar exercise during the session preceded by WBC treatments.

1. Introduction

Biological regeneration treatments, such as sauna or cryostimulation are used to help athletes to better support the training workload, to prevent the deleterious effects of strenuous exercise and to improve a recovery procedure from bodily damage and injury. Beneficial effects of sauna bathing as well as cryotherapy and cryostimulation have been reported by many researchers. Sauna is a valuable clinical tool for cardiovascular, autoimmune, toxicant-induced and other chronic health problems.^{1–9} Cryotherapy effectively reduces soreness and inflammation as well as stimulates the body's natural healing ability and immune function, improves anxiety, depression and mood disorders, enhances surgical recovery.^{10–13} It is widely used in athletics and training to relieve and treat intense and chronic pain associated with an athletic injury and overuse of muscles, tendons and ligaments. The positive effects of whole body cryostimulation (WBC) have been proven in the

field of sport medicine.^{14–16} However, the mechanisms by which sauna bathing or cryotherapy/cryostimulation exert physiological, psychological, and metabolic effects require further research. It is interesting, that despite their polar opposite temperatures, both of these treatments come with a dose of similar health benefits. The use of contrasting temperatures can improve treatment of pain and inflammation, boost the immune system, improve blood flow and muscle movement, detoxification via the skin and lymphatic system, improve ability to adapt to stress, and accelerate recovery from exercise.^{6,7,17}

Exposure to high temperature, despite activating the thermoregulatory reactions, can lead to the accumulation of heat in the body and to an increase in internal body temperature.^{18–20} Raising the internal temperature leads to a series of thermoregulatory reactions such as increased cutaneous blood flow and the secretion of sweat, which evaporation from the skin surface contributes to the elimination of heat from the body. In turn, the action of WBC on the body occurs in two

* Corresponding author.

E-mail address: anna.michnik@us.edu.pl (A. Michnik).

<https://doi.org/10.1016/j.ctim.2020.102453>

Received 12 March 2020; Received in revised form 4 May 2020; Accepted 20 May 2020

Available online 23 May 2020

0965-2299/ © 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

phases. In the first phase, heat loss is inhibited by stimulating the sympathetic nervous system.²¹ This leads to narrowing of the blood vessels in the dermis and subcutaneous tissue, which is accompanied by an increase in the insulating properties of the body, but also the increase in blood pressure. Immediately after the WBC procedure, mechanisms intensifying heat production by increasing the metabolic rate are activated. The consequence of tissue hyperemia is the increase in oxygen concentration in the muscles.²⁴ WBC as well as whole body hyperthermia (WBH) have a number of valuable clinical, hormonal and biochemical effects that persist after the procedure.^{6,14}

Repeated, or continuous application of thermal treatments could induce adaptations that mitigate physiological strain of heat stress, improve thermal comfort and exercise capabilities. Among three primary patterns of cold acclimatization there is a metabolic adjustment.²² Heat acclimation can alter biochemical and immune system parameters, which can be reflected in blood plasma/serum proteome. Telęgław et al.²³ have reported an increased rate of plasma albumin and A/G (the albumins to globulins ratio) indicator associated with the building up of winter swimmers' resistance against cold water after winter swimming. The plasma protein concentrations in the vascular space depend on protein synthesis and catabolism, their distribution between the vascular and extravascular spaces and plasma volume. Variation in plasma volume occur frequently in response to physical exercise, or acclimation, however the intravascular mass of proteins is independent of plasma volume changes.²²

A moderate-intensity and sometimes strenuous exercises are an essential part of the training and offer several important health benefits. However, such exercises increase the risk of injuries, can weaken the immune system temporarily, increase inflammatory processes and have other adverse effects. WBC and sauna treatments are used by athletes for preventing such effects and treating muscle soreness after exercise. The purpose of this study was to evaluate whether heat treatments applied before the exercise session modify athletes' response to the effort of exercise and the recovery period. Its implementation was based on examination of athletes' blood serum in various stages of exercise session using the differential scanning calorimetry (DSC). Recently, this technique has been found useful in the diagnosis and monitoring of diseases^{25–29} and in sport medicine.^{30–40}

2. Materials and methods

2.1. Blood serum samples

A total of 10 professional cross-country skiers (age 23 ± 3 years, height 1.77 ± 1.1 m, body mass 72 ± 10 kg, $\text{VO}_{2\text{max}}$ 60 ± 8 mL $\text{min}^{-1} \text{kg}^{-1}$) participated in the experiment. Our experiment was conducted during the transition phase of the annual training plan aimed at providing sufficient recovery while avoiding a decrease in physical performance. The athletes performed the same exercise tests (~ 60 min, below HR-AT threshold + the heart rate (HR) corresponding to the intensity of exercise at the individual anaerobic threshold (AT); more details in³⁰) in 4 sessions: before and after a series of 10 WBC (8 athletes) or 10 sauna treatments (7 the same as in the session with WBC and 2 other athletes). This test was performed 12 h after last WBH or WBC.

Blood samples were drawn in 4 stages of each session: at rest before exercise (be), 3 min after exercise (ae), after 1 h (r1 h) and 24 h (r24 h) of passive recovery. They were taken from the antecubital vein into the vacutainer tubes with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and assayed for total protein content using the biuret method (Randox Laboratories, UK) by means of the Hitachi 917 Modular P analyser. The electrophoretic separation of protein fractions: albumin, α_1 , α_2 , β_1 , β_2 and γ -globulins were made only for "be" and "ae" states using the fully automated Interlab G26 Proteins Electrophoresis. Serum samples were stored at -20°C . For DSC experiment, serum samples were diluted 20-fold with distilled degassed water. The pH value of the diluted samples

was within the range 6.5–7.0.

The study was approved by the Research Ethics Committee at the Academy of Physical Education in Katowice, Poland.

2.2. WBC and sauna treatments

Prior to the start of the experiment, each participant was examined by a physician to test for any contraindications against cryostimulation or sauna. The study was carried out during the transition phase of the training cycle. In the first of two experiments, the subjects were randomly assigned to one of two methods (WBC or WBH) used in the biological regeneration. Between implementing the second method (different than the one they used earlier), the athletes participated in a training process typical for the preparatory period. The treatment sessions took place once a day for 10 consecutive days, excluding Saturdays and Sundays. The exercise test was performed 12 h after last WBH or WBC.

Cryostimulation sessions were performed in a cryo-chamber located in Upper Silesian Center of Medicine and Rehabilitation in Katowice. Each session of WBC performed at temperature -130°C lasted 3 min. Entry to the cryo-chamber was preceded by a 30-second adaptation period in the vestibule at a temperature of -60°C . Exclusion criteria treatment was hypertension or other contraindications, including intolerance to cold, skin changes pus-gangrenosum, hypothyroidism, local blood circulation disorders, use of certain drugs, claustrophobia, acute respiratory diseases, skin breakdown, lack of informed consent test on cryotherapy treatment.

Finnish sauna treatments procedure was carried out in the sauna-chamber located in Jerzy Kukuczka Academy of Physical Education in Katowice. Each of the ten treatments consisted of repeated cycles of exposure to heat and cold. Each time participants spent a total of 45 min (3×15 min, separated by two 4–6 min showers to cool the body^{41,42}) in sauna (an average temperature at face height $90^\circ \pm 2^\circ\text{C}$, and average relative humidity $12 \pm 4\%$). Exclusion criteria treatment to using the sauna were acute respiratory diseases, hyperthyroidism or hypothyroidism, purulent-gangrenous skin lesions.

2.3. Differential scanning calorimetry

DSC measurements were performed using the VP DSC MicroCal instrument (Northampton, MA) in the temperature range of 20 – 100°C with the heating rate 1°C min^{-1} . A constant pressure of about $1.7 \cdot 10^5$ Pa was exerted on the liquids in the cells. The calorimetric data were corrected for the instrumental baseline water–water. DSC curves were normalized for the gram mass of protein and next a linear baseline was subtracted. An apparent excess heat capacity C_p^{ex} ($\text{J } ^\circ\text{C}^{-1} \text{g}^{-1}$) versus temperature ($^\circ\text{C}$) has been plotted.

The following parameters of the observed endothermic transition have been determined: the temperature and excess heat capacity at maximum (T_m , Q_m), the enthalpy (ΔH) of serum denaturation (calculated as the area under the endothermic peak, expressed in J g^{-1}), the width of peak in its half height (H/HW) and T_{50} (the first moment of the thermal transition with respect to the temperature axis).

2.4. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the Statistica 13 software. For all measures, descriptive statistics were calculated. The Shapiro–Wilk test was used to check the normality of distributions of the studied variables. The homogeneity of variances in analyzed groups was verified by Leven's test. A one-way ANOVA with repeated measures followed by Tukey's *post hoc* test was used to compare values of mean parameters obtained at different stages in the same exercise session. A Mauchly's test for sphericity was included as a part of the procedure. When the data did not fulfill the assumptions required for a parametric test, nonparametric Friedman's ANOVA test was applied. Student *t*-test

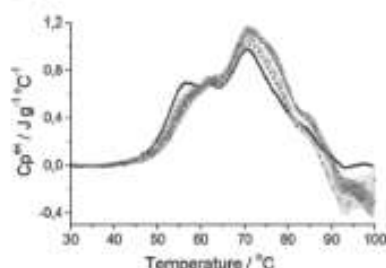


Fig. 1. Mean DSC curves of serum before exercise ("be" - solid black line) and after exercise in the session without thermal treatments ("ae" - dash green line), after 10 WBC treatments ("ae10c" - dot blue line) and after 10 sauna treatments ("ae10s" - dash-dot red line); the shaded area is the standard error of the mean (SEM) at each temperature (gray for "be", green for "ae", cyan for "ae10c", pink for "ae10s" curves). (For interpretation of the references to color in this figure citation, the reader is referred to the web version of this article.)

was used to compare parameters at the same stage in exercise sessions after WBC and sauna treatments. The two-way ANOVA was performed to examine the influence of "exercise" and "treatment" on protein fractions in serum during various sessions. The level of significance was set at $p < 0.05$.

3. Results

The complex endothermic transition observed on the serum DSC curve in the temperature range 40–90 °C represents the weighted sum of denaturation of serum proteins. Such profiles have been described and clarified by us and other authors in previous reports.^{25–40} In a very strong simplification, for lower-temperature transition range the main contribution is from albumin while for higher-temperature from immunoglobulins. It should be mentioned that, even in healthy people there are some differences in these profiles, depending on the solvent used and the pH. Mean DSC curves of serum from blood acquired before exercise and after exercise in sessions without thermal treatments, after 10 WBC treatments and after 10 sauna treatments are compared in Fig. 1. Clear decrease in intensity of DSC curves in the temperature range 50–60 °C and an increase in the range of about 65–80 °C is visible after exercise relative to the state before exercise. This effect is strongest in the exercise session after sauna treatments, which suggests that sauna treatments increased the effort involved in exercising. DSC curves presented in Fig. 1 suggest also that WBC treatments slightly weakened changes in blood serum, being the source of the changes observed on DSC curves. Fig. 2A and B shows that mean DSC curves of serum after 1 h and 24 h recovery are similar to "be" curve, so changes caused by exercise relatively quickly disappear.

Results shown in Table 1 indicate changes of parameters of the analyzed endothermic transition after exercise and then their return to pre-exercise values after rest. Regardless of applying heat treatments before the exercise session, an increase of T_m , Cp_m , T_{PM} and a decrease of HHW have been observed after exercise compared to before exercise stage. With the exception of Cp_m and T_{PM} corresponding to the session after WBC treatments, differences between compared mean values of these parameters before and after exercise have been found statistically significant. Significant differences have been detected between the "ae" and other stages of exercise session without thermal treatments for T_m and T_{PM} ($p < 0.0001$ in ANOVA with repeated measures and $p < 0.001$ in Tukey's post hoc test for both parameters), Cp_m ($p < 0.0002$ in ANOVA with repeated measures and $p < 0.01$ in Tukey's post hoc test) and HHW ($p < 0.001$ in Friedman nonparametric test). After WBC treatments such differences have been found significant only for T_m ($p = 0.001$ in Friedman test). Significantly higher Cp_m and T_{PM} values were observed at "ae" stage in session after

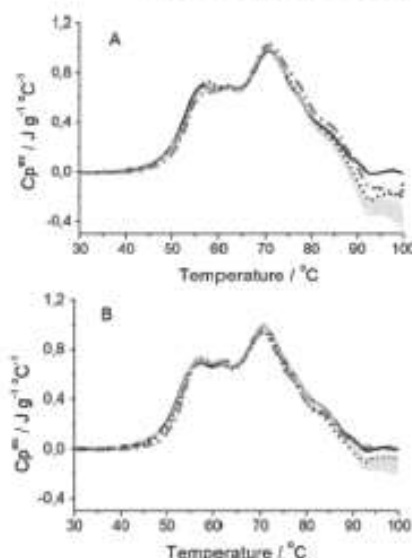


Fig. 2. Mean DSC curves of serum after 1-h (A) and 24-h (B) recovery in the session without thermal treatments (dash green line), after 10 WBC treatments (dot blue line) and after 10 sauna treatments (dash-dot red line) in comparison with before exercise curve ("be" - solid black line); the shaded area is the standard error of the mean (SEM) at each temperature (shown for "be" and "without treatments" curves). (For interpretation of the references to color in this figure citation, the reader is referred to the web version of this article.)

sauna treatments in comparison with WBC ($p = 0.005$ and $p = 0.001$, respectively in t-Student test). Analogous differences persisted after 1-h recovery period ($p = 0.01$ and $p = 0.01$, respectively). These parameters differed significantly from their values at other stages of the session after sauna treatments ($p = 0.001$ for Cp_m and $p = 0.015$ for T_{PM} in Friedman test). As indicated in Table 1, excluding the session after WBC, HHW values were significantly lower at "ae" stage in relation to others. The enthalpy of serum denaturation did not change within the limits of experimental error; therefore, it was not shown in the table.

Analysis of biochemical data (Table 2) showed a statistically significant increase in total protein (TP) after exercise. This increase is due to an increase in albumin ($p = 0.001$), α_1 -globulin ($p = 0.04$), α_2 -globulin ($p = 0.001$), and β_1 -globulin ($p = 0.003$) levels in "ae" relative to "be" state (data not shown). However, no significant difference between these two states, when considering the % of the protein fractions in serum (presented in Table 2). The percentage values are less sensitive to changes in plasma volume than absolute values. The results of the statistical analysis of these data showed some significant differences only for the factor "treatment": higher % of albumin after 10 WBC in comparison with "no treatments", lower % of β -globulins and higher % of γ -globulins after sauna in comparison with WBC treatments.

4. Discussion

Despite the opposite direction of temperature changes induced in the body during treatments, both considered thermal methods, WBC and sauna, are useful for enhancing human metabolism and are effective in recovery after exercise. The exposure to the extreme cold tricks the body into thinking that it is in hypothermia, causing it to increase the metabolic rate in order to increase heat production to protect the core of the body. The sauna treatment also initiates an increase in metabolic rate which lasts for a few hours after leaving the sauna. It has

Table 1
Mean ($\pm$ SD) parameters of serum DSC transition.

Stage	Exercise session	$T_m/^\circ\text{C}$	$Cp_m/\text{kg}^{-1}\text{ }^\circ\text{C}^{-1}$	$HW/^\circ\text{C}$	$T_{50}/^\circ\text{C}$
"be"	no treatments	70.67 $\pm$ 0.32	0.989 $\pm$ 0.062	25.4 $\pm$ 1.1	67.17 $\pm$ 0.74
	WBC	70.50 $\pm$ 0.33	0.960 $\pm$ 0.080	25.1 $\pm$ 1.5	67.01 $\pm$ 0.73
	sauna	70.30 $\pm$ 0.47	0.990 $\pm$ 0.038	26.3 $\pm$ 0.6	67.09 $\pm$ 0.47
"ae"	no treatments	71.27 $\pm$ 0.57 ^a	1.070 $\pm$ 0.087 ^a	23.7 $\pm$ 1.7 ^a	68.09 $\pm$ 0.83 ^a
	WBC	71.49 $\pm$ 0.40 ^b	1.029 $\pm$ 0.069	24.5 $\pm$ 1.5	67.76 $\pm$ 0.78
	sauna	71.13 $\pm$ 0.17 ^b	1.138 $\pm$ 0.065 ^c	23.1 $\pm$ 1.4 ^c	69.81 $\pm$ 0.77 ^c
"r1 h"	no treatments	70.67 $\pm$ 0.45	1.007 $\pm$ 0.081	24.6 $\pm$ 1.2	67.10 $\pm$ 1.15
	WBC	70.68 $\pm$ 0.44	0.988 $\pm$ 0.032	25.5 $\pm$ 1.5	67.12 $\pm$ 0.66
	sauna	70.97 $\pm$ 0.81	1.034 $\pm$ 0.033	25.4 $\pm$ 0.7	68.56 $\pm$ 0.99
"r24 h"	no treatments	70.57 $\pm$ 0.22	0.999 $\pm$ 0.068	25.4 $\pm$ 1.3	67.15 $\pm$ 0.78
	WBC	70.47 $\pm$ 0.13	0.940 $\pm$ 0.036	24.8 $\pm$ 0.9	66.96 $\pm$ 0.70
	sauna	70.73 $\pm$ 0.79	0.954 $\pm$ 0.041	24.7 $\pm$ 0.4	67.73 $\pm$ 0.46

^a Indicates differences statistically significant relative to all other stages of the same exercise session.

^b Regarding to "be" stage of the same session; ANOVA with repeated measures (followed by Tukey's post hoc test) or Friedman nonparametric test were employed.

been suggested that sauna bathing enhances elimination of toxins from the body as a result of increased sweating.⁴³ It can be expected that the accelerated metabolism caused by thermal treatments or physical activity in combination with thermal treatments will be reflected also in blood and blood serum/plasma. We assumed that the application of DSC technique can exhibit changes in serum proteome connected with this modified metabolism. DSC profile of blood serum or plasma is a composite of the denaturation behavior of each of the component proteins weighted according to their concentration within these physiological fluids. It is sensitive to interactions between major abundant proteins, i.e. albumin, immunoglobulins with peptides and other ligands.²⁵

The effect of whole-body cryostimulation on blood serum thermal denaturation transition for professional cross-country skiers was reported by us not long ago.^{10,40} Now, we have tried to compare in a similar way, effects of WBC and sauna treatments on the cost of effort during exercise in the same group of athletes. The primary finding of the present study is that a series of 10 treatments applied before the exercise session, in the case of WBC slightly weakens, and in the case of sauna clearly strengthens the observed response to the exercise. Post-exercise changes in DSC profiles of athlete's blood serum in the session held after sauna treatments are similar in character but stronger than those in the session not preceded by treatments. Interestingly, sauna treatments alone do not significantly modify serum denaturation transition. So, only in conjunction with physical exercise, the exogenous heat exposure has similar effect on the serum DSC profile as the exercise itself. The idea of such synergy is consistent with recent data suggesting that a combination of regular physical activity and sauna baths confers substantial risk reduction for stable cardiovascular disease compared with each modality alone.⁴⁴ It is also in line with the recent results of Ketelhut & Ketelhut⁴⁵ showing that the acute heat exposure in the sauna is a burden comparable to moderate physical exercise. Similarity between the positive effects of sauna and a moderate-intensity physical

exercise on lipid profile was indicated by Gryka et al.⁴⁶ It was also noted in other research that although the sauna is most commonly used as a relaxation treatment, some of the changes caused by such external heat stress are similar to those obtained after exercise-associated internal stress.^{47,48}

We suspect that one of the causes of post-exercise changes observed in our study may be oxidative protein modification. Oxidation of proteins, which are major targets for oxidation, can give rise to their conformational changes and unfolding.^{49–51} Various types of exercises are thought to promote the generation of reactive oxygen species (ROS). These exercise-induced ROS are potentially detrimental to muscle function and lead to muscle fatigue and muscle atrophy. However, ROS produced during exercise also have positive effects by influencing cellular processes that lead to increased expression of antioxidants.⁵² Both very low and very high temperatures are considered to be the environmental factors that cause an increased generation of ROS in the human organism. Sutkowsky et al.⁵³ have compared a single WBC procedure versus single dry sauna bath on the oxidant-antioxidant equilibrium in the blood of healthy men. Their results revealed that cryostimulation induces an increase in the production of ROS in humans which is insufficient to cause oxidative stress but enough to trigger beneficial antioxidant processes. A single dry sauna procedure was found to have a similar effect. Zinchuk and Zhadzko,⁴⁶ who exposed athletes to a single and repeated sauna bathing sessions, suggested that systematic sauna procedures in athletes provide adaptations of oxygen-binding blood properties and mechanisms of antioxidant protection via NO-dependent processes, which can increase the athletes body's resistance to various stress inducing factors. Pilch et al. have reported that the use of sauna induced a shift in pro-oxidant-antioxidant balance towards oxidation less intensively in the athletes compared to the untrained men.⁴⁷

The predominant serum protein is albumin. Thus, the free radical-trapping activity of serum is largely due to serum albumin. The

Table 2
Mean ($\pm$ SD) biochemical parameters.

	no treatments		WBC		sauna	
	"be"	"ae"	"be"	"ae"	"be"	"ae"
TP /g L ⁻¹	78.8 $\pm$ 3.3	84.4 $\pm$ 4.5	76.7 $\pm$ 3.7	82.6 $\pm$ 3.3	77.6 $\pm$ 5.6	82.9 $\pm$ 6.5
Albumin	53.6 $\pm$ 3.4	52.9 $\pm$ 2.4	56.4 $\pm$ 2.2	55.1 $\pm$ 2.0	54.3 $\pm$ 2.5	53.3 $\pm$ 2.4
/ %						
α_1 -globulins/%	2.1 $\pm$ 0.4	2.2 $\pm$ 0.3	2.1 $\pm$ 0.3	2.2 $\pm$ 0.5	2.0 $\pm$ 0.4	2.2 $\pm$ 0.4
α_2 -globulins/%	12.4 $\pm$ 1.1	12.4 $\pm$ 0.9	11.5 $\pm$ 0.8	11.6 $\pm$ 0.5	11.7 $\pm$ 1.2	12.0 $\pm$ 1.4
β_1 -globulins/%	9.4 $\pm$ 0.9	9.6 $\pm$ 1.0	9.5 $\pm$ 0.9	9.9 $\pm$ 0.9	8.5 $\pm$ 0.4	8.7 $\pm$ 0.3
β_2 -globulins/%	5.2 $\pm$ 0.9	5.2 $\pm$ 1.0	5.7 $\pm$ 0.7	5.6 $\pm$ 0.6	4.7 $\pm$ 0.5	4.7 $\pm$ 0.7
γ -globulins	17.3 $\pm$ 2.6	17.7 $\pm$ 2.9	14.9 $\pm$ 1.2	15.5 $\pm$ 1.4	18.6 $\pm$ 4.1	19.3 $\pm$ 4.0
/ %						

oxidation of serum albumin caused by oxidative stress following exhaustive and demanding exercise has been reported by Imai et al.⁵⁵ Therefore, it seems likely that the observed clear changes in the shape of the denaturation transition of athletes' blood serum after the exercise may be related to this process. Bruschi et al.⁵⁴ results confirmed a thermal stabilization of albumin structure upon oxidation. Significant differences between DSC profiles of oxidized (from focal segmental glomerulosclerosis patients) and non-oxidized albumin have been found.^{56,57} DSC profiles of the oxidized *in vitro* blood plasma from a healthy volunteer have been recently presented by Tenchov et al. [Fig. 7 in 34]. The trends of shown oxidation-related changes are similar to post-exercise changes observed in our experiment. According to results reported recently by Gorobets et al.⁵⁸ regarding denaturation transition observed in DSC curve for albumin, the lower-temperature portion of the endotherm decreases while the portion of the higher-temperature endotherm increases upon oxidation of albumin molecules. Thus, post-exercise decline of the intensity in the lower-temperature part of serum denaturation transition and an increase of C_p recorded in current study can be, at least in part, explained by the increase in the concentration of oxidized albumin. A contribution to the increased post-exercise value of C_p , especially after sauna treatments, may also come from γ -globulins, which % content after WBH was higher in comparison with WBC treatments. However, it is worth noting that no significant difference has been found in the % content of albumin as well as other protein fractions between pre- and post-exercise states.

Relatively quick return of serum denaturation transition to pre-exercise shape suggests the restoration of a fraction of non-oxidized albumin molecules within a day of rest. It agrees with results reported by Lamprecht et al.⁵⁹ that after the exercise test human mercaptoalbumin (HMA; reduced) was primarily oxidized to its reversible fraction human nonmercaptoalbumin 1 (HNA1) and 30 h were sufficient to recover plasma proteins from oxidative modification. Additionally, oxidized albumin clearance in the body is more rapid compared with reduced albumin.⁶⁰

5. Conclusions

DSC denaturation characteristics of serum solutions have demonstrated specific post-exercise changes in all experimental sessions, slightly weaker in the session after 10 WBC treatments and significantly stronger after 10 sauna treatments than in sessions before a treatment cycles. The main findings of the current study indicate that an exercise performed by athletes after a series of sauna treatments leads to greater modification of the blood serum proteome than the similar exercise during the session preceded by WBC treatments.

DSC could be a useful tool in the detection of the changes in athletes' blood serum in response to exercise and choosing appropriate regeneration treatments in sports training.

Practical application

This study is one of the first reports to describe with calorimetric approach human body's response to exercise after a series of cryostimulation or sauna treatments.

Prolonged use of WBC or sauna before an exercise session accordingly weakens and enhances the athlete's response to effort. Excessive increase in the post-exercise response, additionally enhanced with sauna treatments, may be dangerous for human health. However, a cycle of sauna treatments before an exercise session can help increase the efficiency of adaptive changes to physical effort in people who are in good health. So, combining sauna bathing with regular physical activity is an attractive option to enhance exercise-related health outcomes, if used sensibly and with caution.

Overall, these findings are important for exercise physiologists, fitness professionals, and others who design exercise programs and promote physical activity in the adult population.

Author contributions

Hona Pokora designed and conducted the study with professional cross-country skiers and collected information about the participants. Ewa Sadowska-Krępa prepared biological research material and provided the blood serum samples. Anna Michnik and Klaudia Duch prepared samples for measurements, carried out the DSC experiment and DSC data analysis. Anna Michnik performed statistical analysis and wrote the manuscript.

All authors critically reviewed the manuscript and approved the final version.

Data availability

The dataset used to support the findings of this study are available from the corresponding authors upon request.

Funding

The project was supported by the grant Ministry of Science and Higher Education /Nr0050/RS4/2016/54.

CRediT authorship contribution statement

Anna Michnik: Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Methodology, Supervision, Validation, Visualization, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Klaudia Duch:** Data curation, Formal analysis, Investigation. **Hona Pokora:** Conceptualization, Investigation, Funding acquisition, Project administration, Writing - review & editing. **Ewa Sadowska Krępa:** Data curation, Supervision, Writing - review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgments

The authors thank the participants for their participation in the project. The project was supported by the grant Ministry of Science and Higher Education /Nr 0050/RS4/2016/54.

References

1. Laakkonen JA, Laakkonen T, Kunttinen HK. Cardiovascular and other health benefits of sauna bathing: A review of the evidence. *Mayo Clin Proc.* 2018;93(11):1111–1121.
2. Kilbasa T, Bittl S, Ikeda Y, et al. Effects of repeated sauna treatment on ventricular arrhythmias in patients with chronic heart failure. *Circ J.* 2004;68(11):1151–1155.
3. Muraoka A, Kaga Y, Hattakamori M, Minagoe R, Chikui T. The effects of repeated thermal therapy for patients with chronic pain. *Psychiatr Psychosom.* 2005;74:286–294.
4. Nguyen Y, Nasser H, Friedman WH. Sauna as a therapeutic option for cardiovascular disease. *Circul Rev.* 2004;12:321–324.
5. Blum H, Blum A. Beneficial effects of sauna bathing for heart failure patients. *Exp Clin Gerontol.* 2007;13(1):29–32.
6. Crimmins WJ. Sauna as a valuable clinical tool for cardiovascular, autoimmune, toxicant-induced and other chronic health problems. *Altern Med Rev.* 2011;16(2):215–225.
7. Hamaiz J, Cohen M. Clinical effects of regular dry sauna bathing: A systematic review. *J Evid Based Complement Altern Med.* 2018;2018:1–30. <https://doi.org/10.1155/2018/1857413> 30 pages.
8. Lemmon RD, Cochran-Sternquist M. Safety and tolerability of sauna detoxification for the protracted withdrawal symptoms of substance abuse. *J Am Med Res.* 2018;46:4480–4490.
9. Hamaiz JN, Gravaes BN, Cohen MM. A hot topic for health: Results of the Global Sauna Survey. *Complement Ther Med.* 2019;44:223–234.
10. Rymaszewska J, Rattsey D, Chłodzińska-Kępa S. Whole-body cryotherapy as adjunct treatment of depressive and anxiety disorders. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2008;56:63–68.
11. Stanek A, Sierot-Guizy K, Romak E, et al. Whole-body cryostimulation as an effective method of reducing oxidative stress in healthy men. *Adv Clin Exp Med.* 2016;25:1283–1291.
12. Stanek A, Chłodzińska A, Wólczyński T, Romak E, Sierot A. Whole-body

- cryotherapy decreases the levels of inflammatory, oxidative stress, and atherosclerosis plaque markers in male patients with active-phase ankylosing spondylitis in the absence of classical cardiovascular risk factors. *Rheumatoid Arthritis of Spondylarthritis*. 2018;65(5):532. <https://doi.org/10.1155/2018/532532>. 11 pages.
13. Contello JT, Baker PRA, Minetti GM, Steunen F, Stewart IB, Housley C. Whole-body cryotherapy (extreme-cold air exposure) for preventing and treating muscle aches after exercise in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015;9(3):CD010786. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD010786.pub2>.
 14. Lombardi G, Ziemann U, Hallett G. Whole-body cryotherapy in athletes: from therapy to stimulation. An updated review of the literature. *Front Physiol*. 2017;8(258):1–16. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00258>.
 15. Housley C, Leoni J, Steunen F, et al. Effects of whole-body cryotherapy vs. Fenn-Brand vs. passive modalities on recovery from exercise-induced muscle damage in highly-trained runners. *PLoS One*. 2013;8(2):e7749.
 16. Krüger M, de Maess M, Dittmar K, Spöck R, Meiser J. Whole-body cryotherapy's enhancement of acute recovery of running performance in well-trained athletes. *Int J Sports Physiol Perform*. 2015;10(6):612.
 17. Hoffmann R, Teyssie J, Bayona JP, Clarys P, Clarys R. The effect of post-exercise cryotherapy on recovery characteristics: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2015;10(10):e0139328. doi: 10.1371/journal.pone.0139328.
 18. Schibler AM, Ayres JS. Thermoregulation at a disease tolerance defense strategy. *Physiol Rev*. 2016;96(4):1606–1616. <https://doi.org/10.1085/physrev.00042>.
 19. Wessli D, van Loon LJ, Lachmann W. Thermoregulation during exercise in the heat: Strategies for maintaining health and performance. *Sports Med*. 2017;47(10):1409–1422.
 20. Kenny GP, Jay O. Thermoregulation, calorimetry, and mean body temperature during heat stress. *Compr Physiol*. 2013;3(1):689–1719.
 21. Rukony P, Włodzik A, Benczyński T, Miś-Klemoniewska C, Benczyński M. The effect of a single Finnish sauna bath after aerobic exercise on the oxidative status in healthy men. *Scand J Clin Lab Invest*. 2014;74(3):39–44.
 22. Castellani JW, Young AJ. Human physiological responses to cold exposure: Acute responses and acclimatization to prolonged exposure. *Annu Rev Physiol*. 2016;78:63–74.
 23. Tęchlik A, Marchewka J, Marchewka A, Kalpa J. Changes in biochemical properties of the blood in winter swimmers. *Polish J Sport Sci (Kine)*. 2016;34(2):285–290. <https://doi.org/10.5606/PS.16.4.285>.
 24. Kuch G, Rieker L. Plasma volume and intravascular protein masses in trained boys and fit young men. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*. 1977;43(6):1085–1088.
 25. Garbett NC, Miller JJ, Jones AB, Chano JB. Calorimetry inside the box: A new window into the plasma proteome. *Biophys J*. 2008;94(13):77–1383.
 26. Barólo F, Cerdá JJ, Gutiérrez A, et al. Characterization of monoclonal gammopathy of undetermined significance by calorimetric analysis of blood serum proteome. *PLoS One*. 2015;10(15). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130316>.
 27. Garbett NC, Mekumayr CK, Helm W, Jones AB, Chano JB. Differential scanning calorimetry of blood plasma for clinical diagnosis and monitoring. *Exp Mol Pathol*. 2008;86:166–170.
 28. Michnik A, Ormaza Z, Michalik K, et al. Differential scanning calorimetry study of blood serum in chronic obstructive pulmonary disease. *J Therm Anal Calorim*. 2010;102:57–60.
 29. Todorova S, Krumova B, Gatcheva I, Ch Rabaeva, Tanova M. Microcalorimetry of blood serum proteome: A modified interaction network in the multiple myeloma case. *Anal Chem*. 2011;83(7):7992–7998.
 30. Polak T, Zapł I, Ferenc A, Lortz D. Differential scanning calorimetry (DSC) analysis of human plasma in melanoma patients with or without regional lymph node metastases. *J Therm Anal Calorim*. 2012;108(1):49–152.
 31. Krumova S, Todorova S, Danalova A, et al. Calorimetric features of IgM gammopathies. Implication for patient's diagnosis and monitoring. *Thrombostasis*. 2015;6(1):23–28. <https://doi.org/10.1016/j.tst.2015.07.002>.
 32. Kędra-Królik K, Chmielewska I, Michnik A, Zarycki P. Blood serum calorimetry indicates the chemotherapeutic efficacy in lung cancer treatment. *Scientific Reports*. 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17004-2>.
 33. Michnik A, Sadowska-Kępa E, Cholewa J, Schibler I, Kęrbon A, Ormaza Z. Differential scanning calorimetry study of early and advanced stages in Parkinson's disease using human blood serum. *Thrombostasis*. 2018;9(2):54–58.
 34. Tęchlik A, Kęrbon A, Antkowiak B, et al. Blood plasma thermal behavior and protein oxidation as indicators of multiple sclerosis clinical status and plasma exchange therapy progression. *Thrombostasis*. 2016;7(1):103–109.
 35. Ferenc A, Lortz D. Surgical stress detection in human blood plasma by DSC. *J Therm Anal Calorim*. 2020. <https://doi.org/10.1007/s10973-020-09513-w>.
 36. Michnik A, Ormaza Z, Popraciński A, Cuda M, Kompa K, Sadowska-Kępa E. DSC serum profiles of sprinters. *J Therm Anal Calorim*. 2013;111:365–370.
 37. Michnik A, Sadowska-Kępa E, Demasiński P, Duch K, Polak T. Blood serum DSC analysis of well-trained men response to CrossFit training and green tea extract supplementation. *J Therm Anal Calorim*. 2017;130(1):253–1262.
 38. Michnik A, Ormaza Z, Schibler I, Popraciński A, Cuda M. Diversity in athlete's response to strength effort in normohydric hyponatremic DOC study. *J Therm Anal Calorim*. 2018;134:635–641.
 39. Duch K, Michnik A, Polak T, Sadowska-Kępa E, Kęrbon A. Whole-body cryostimulation impact on blood serum thermal denaturation profiles of cross-country skiers. *J Therm Anal Calorim*. 2019;138(4):4505–4511. <https://doi.org/10.1007/s10973-019-08766-0>.
 40. Michnik A, Polak T, Duch K, Sadowska-Kępa E. Differential scanning calorimetry reveals that whole-body cryostimulation in cross-country skiers can modify their response to physical effort. *J Therm Anal Calorim*. 2020. <https://doi.org/10.1007/s10973-020-09513-w>.
 41. Tyka A, Polak T, Tyka AK, Szygala Z, Chod T. Repeated sauna bathing effects on male capacity to prolonged exercise-heat performance. *Med Sport*. 2008;12(150–154). <https://doi.org/10.2478/v10036-008-0028-4>.
 42. Pliś W, Lech G, Polak T, Blach W, Tota Ł, Chod T. The knowledge about using Finnish sauna in post-event recovery among judokas. *J Rehabil Sports Med*. 2014;5:43–47. <https://doi.org/10.5606/2013.11.27453>.
 43. Laakkonen JA, Laakkonen T, Kumpulainen S. In reply—Sauna bathing and healthy sweating. *Mayo Clin Proc*. 2014;89(7):727–728.
 44. Laakkonen JA, Kumpulainen SK. Is sauna bathing protective of sudden cardiac death? A review of the evidence. *Prog Cardiovasc Dis*. 2019;62(3):288–293. <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2019.05.001>.
 45. Kumpulainen S, Kumpulainen SK. The blood pressure and heart rate during sauna bath compared to cardiac responses during submaximal dynamic exercise. *Complement Ther Med*. 2014;24(2):218–222.
 46. Gryk D, Pliś W, Wozniak M, Szygala Z, Tota Ł. The effect of sauna bathing on lipid profile in young, physically active, male subjects. *Int J Occup Med Environ Health*. 2014;27(6):604–610.
 47. Pliś W, Szygala Z, Tyka AK, et al. Disturbances in pro-oxidant-antioxidant balance after passive body overheating and after exercise in elevated ambient temperatures in athletes and untrained men. *PLoS One*. 2014;9(11):e108520.
 48. Zychowska M. Changes in expression of selected cellular stress response genes after passive body overheating in sauna and moderate exercise in male athletes and untrained people. *Arch Biochem Biophys*. 2017;137:1–78.
 49. Davies MJ. The oxidative environment and protein damage. *Biochem Biophys Acta*. 2006;1763:93–109.
 50. Davies MJ. Protein oxidation and peroxidation. *Biochem J*. 2016;473(1):65–825.
 51. Bruch M, Candiano G, Semerari L, Gligotti GM. Oxidized albumin: The long way of a protein of universal function. *Biochem Biophys Acta*. 2013;1831:5473–5479.
 52. Stashchuk P, Fickl P. Impact of oxidative stress on exercising skeletal muscle. *Biochem Biophys Acta*. 2015;185:356–377.
 53. Sulkowicz P, Włodzik A, Rajewski P. Single whole-body cryostimulation procedure versus single dry sauna bath: Comparison of oxidative impact on healthy male volunteers. *Rheumatoid Arthritis of Spondylarthritis*. 2015;65(5):532. <https://doi.org/10.1155/2015/532532>. 6 pages.
 54. Zichuk V, Zhdanov D. Sauna effect on blood oxygen transport and proinflammatory mediators in athletes. *Med Sport*. 2012;34(1):189–189.
 55. Tota Ł, Hayashi T, Nagawa T, et al. Intensive exercise-induced changes in redox state of human serum albumin during intensive kendo training. *Appl Physiol*. 2002;33(1):91–93.
 56. Bruch M, Musante L, Gligotti G, Rialdi G, Candiano G. Comparative study of thermal stability of healthy and focal segmental glomerulosclerosis plasma albumin. *J Therm Anal Calorim*. 2007;87:27–31.
 57. Musante L, Candiano G, Perotto A, et al. Active oval segmental glomerulosclerosis is associated with massive oxidation of plasma albumin. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18(7):99–109.
 58. Gurevitz M, Wasserman LA, Bychkova AV, Rosenfeld MA. Thermodynamic features of lysine and histidine serum albumin under ozone and hydrogen peroxide induced oxidation studied by differential scanning calorimetry. *Chem Phys*. 2019;523:34–41.
 59. Lamprecht M, Greflinger W, Schwaberg G, Holmann P, Oehl R. Single bouts of exercise affect albumin redox state and carbonyl groups in plasma protein of trained men in a workload-dependent manner. *J Appl Physiol*. 2008;104(1):111–117.
 60. Fico T, Arai M, Hatake M, et al. The structural and pharmacokinetic properties of oxidized human serum albumin, advanced oxidation protein products (AOPP). *Drug Metab Pharmacokinet*. 2006;21(1):69–146.

Anna Michnik

Chorzów, 01.06.2022

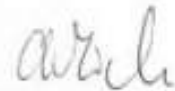
Instytut Fizyki, Uniwersytet Śląski

ul. 75 Pułku Piechoty 1a, 41-500 Chorzów

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Michnik A, Duch K, Pokora I, Sadowska-Krępa E, *Differences in cryostimulation and sauna effects on post-exercise changes in blood serum of athletes*, in: *Complementary Therapies in Medicine*, vol. 51, Elsevier, DOI 10.1016/j.ctim.2020.102453, ISSN 0965-2299, 2020, 102453, mój udział polegał na: stworzeniu koncepcji publikacji, nadzorowaniu badań DSC, czynnym udziale w opracowaniu i analizie wyników, napisaniu i edycji manuskryptu.



.....
Podpis

Iłona Pokora

Chorzów, 01.06.2022

Zakład Fizjologii, Katedra Nauk Fizjologicznych i Medycznych

Akademia Wychowania Fizycznego im. J. Kukuczki

ul. Mikołowska 72a, 40-065 Katowice

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Michnik A, Duch K, Pokora I, Sadowska-Krępa E, *Differences in cryostimulation and sauna effects on post-exercise changes in blood serum of athletes*, in: *Complementary Therapies in Medicine*, vol. 51, Elsevier, DOI 10.1016/j.ctim.2020.102453, ISSN 0965-2299, 2020, 102453, mój udział polegał na: stworzeniu koncepcji projektu badawczego, organizacji badań, w tym rekrutacji uczestników oraz nadzorze nad prowadzonymi badaniami i czynnym udziale w pisaniu i edycji manuskryptu.



Podpis

Ewa Sadowska-Krępa

Chorzów, 01.06.2022

Katedra Nauk Fizjologicznych i Medycznych

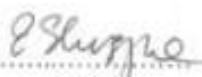
Akademia Wychowania Fizycznego im. J. Kukuczki

ul. Mikołowska 72a, 40-065 Katowice

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Michnik A, Duch K, Pokora I, Sadowska-Krępa E, *Differences in cryostimulation and sauna effects on post-exercise changes in blood serum of athletes*, in: *Complementary Therapies in Medicine*, vol. 51, Elsevier, DOI 10.1016/j.ctim.2020.102453, ISSN 0965-2299, 2020, 102453, mój udział polegał na: nadzorze nad prowadzonymi badaniami biochemicznymi, czynnym udziale w analizie badań biochemicznych, czynnym udziale w pisaniu i edycji manuskryptu.


.....
Podpis

5.6. Michnik A, Sadowska-Krępa E, Kielboń A, Duch K, Bańkowski S. Blood serum denaturation profile examined by differential scanning calorimetry reflects the effort put into ultramarathon by amateur long-distance runners. Journal of Thermal Biology (2021) doi 10.1016/j.jtherbio.2021.103013

Impact Factor czasopisma: 2.902.

Liczba punktów ministerialnych MEiN: 70 pkt.

DOI: 10.1016/j.jtherbio.2021.103013

Mój udział w załączonym artykule polegał na: wykonaniu części pomiarów DSC, czynnym udziale w opracowaniu i analizie wyników, czynnym udziale w edycji manuskryptu.

Wkład pozostałych współautorów, w formie oświadczeń, zamieszczono na końcu artykułu.



Blood serum denaturation profile examined by differential scanning calorimetry reflects the effort put into ultramarathon by amateur long-distance runners

Anna Michnik^a, Ewa Sadowska-Krępa^{b,*}, Agnieszka Kielboń^a, Klaudia Duch^a, Sebastian Bańkowski^b

^a Faculty of Science and Technology, Institute of Biomedical Engineering, The Silesian Centre for Education and Interdisciplinary Research, University of Silesia in Katowice, ul. 75 Pułku Piechoty 1A, 41-500, Chorzów, Poland

^b The Jerzy Kukuczka Academy of Physical Education in Katowice, Institute of Sport Sciences, ul. Mikołowska 72a, 40-065, Katowice, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

Amateur runners
Differential scanning calorimetry (DSC)
Human blood serum
Protein thermal denaturation
Ultramarathon run

ABSTRACT

The impact of participation in the ultramarathon on the health and mental and physical condition is very complex. Undoubtedly, exercise brings many benefits but also involves health risks. Especially such an extreme effort as the one associated with finishing the ultramarathon run, can be dangerous to the health of the runner. With the variety of possible biomarkers of excessive fatigue that threaten health and life, a question arises which of them are the best and which should be considered in amateur long-distance runners showing particularly high individual variability. In this study differential scanning calorimetry (DSC) has been applied to show the overall effect of the 12-h run on blood sera of participants. Serum samples were obtained from the blood of ten male amateur long-distance runners, collected before and immediately after the run. Distinct changes in the shape of DSC curves have been observed for serum after finishing the run relative to pre-race serum. Statistically significant differences between stages "before" and "after" ultramarathon running have been found for parameters of the endothermic transition associated with denaturation of serum proteins. An increase in the temperature (from 70.9 ± 0.9 to 75.8 ± 2.9 °C) and excess heat capacity (from 0.859 ± 0.201 to 1.102 ± 0.226 Jg⁻¹ °C⁻¹) at peak maximum, the enthalpy of serum denaturation (from 18.55 ± 6.52 to 22.08 ± 5.61 Jg⁻¹) and the first moment of the thermal transition with respect to the temperature (from the value of 67.0 ± 2.1 to 72.6 ± 2.1 °C) has been observed. These results show a clear impact of running an ultramarathon on the participant's blood serum.

1. Introduction

Ultramarathon run is a unique sport that has been growing in popularity in recent years. An ultramarathon can be defined as any running performance lasting for longer than 6 h and/or longer than the classical marathon distance of 42.195 km (Knechtle and Nikolaidis, 2015, 2018; Scheer et al., 2020). Although the long distance puts high physical demands on the runner, the popularity of ultramarathon participation increases also among amateur athletes. It seems obvious that such extreme forms of recreation as marathons or ultramarathons demand very good physical conditions great mental preparation and involve health risks. Therefore, these sports are becoming more and

more interesting for scientific research. Ultramarathoners are a group of athletes that has been little studied in terms of the physiology of systems or metabolic processes. More reliable studies have been conducted among shorter distance runners, but extrapolating conclusions from marathon runners to ultra-runners appears to be an abuse. Additionally, environmental factors such as a heat or humidity can affect the thermoregulatory and metabolic responses of long distance runners (Rodrigues Júnior et al., 2020). Ultramarathoners differ from marathoners regarding anthropometry and training (Knechtle and Nikolaidis, 2015). Ultramarathoners are older (the average age of an ultra endurance athlete is 45 years) and have a larger weekly training volume but run more slowly during training compared to marathoners (Knechtle

* Corresponding author.

E-mail addresses: anna.michnik@us.edu.pl (A. Michnik), e.sadowska-krępa@pwr.katowice.pl (E. Sadowska-Krępa), agnieszka.kielbon@gmail.com (A. Kielboń), klaudia.duch@us.edu.pl (K. Duch), s.banowski@pwr.katowice.pl (S. Bańkowski).

<https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2021.103013>

Received 21 January 2021; Received in revised form 15 April 2021; Accepted 30 May 2021

Available online 8 June 2021

0306-4565/© 2021 The Authors.

Published by Elsevier Ltd.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

and Nikolaidis, 2016). So far, most of participants in ultramarathon events were male.

Several review papers and articles provide a brief overview of the recent literature and trends in ultramarathon running and present the current state of knowledge on the topic of physiology and pathophysiology of such extreme efforts (Knechtle and Nikolaidis, 2016; Spittler and Oberle, 2019; Tiller, 2019; Martinez-Navarro et al., 2020). Physiological, pathophysiological, and metabolic responses to ultra-endurance exercise have been also investigated in nonelite and amateur ultramarathon participants (Waskiewicz et al., 2012; Elapeinika et al., 2013; Hoppel et al., 2019). There is a constant increase in literature regarding ultramarathon-specific illnesses and injuries, nutrition guidelines, psychology, physiologic changes, training methods, and equipment (Hoffman et al., 2014; Hoffman, 2016; Knechtle, 2017). Scientists also tried to understand the motivation of ultramarathoners during the races and preparatory periods (Waskiewicz et al., 2019). There is still limited understanding of the psychological characteristics of ultramarathon runners.

Ultramarathoners are prone to numerous illnesses and injuries, which range from minor skin breakdown to sudden death. After extreme running effort, the development of the Acute Kidney Injury (AKI) often appears (Kao et al., 2015). According Spittler & Oberle review article (Spittler and Oberle, 2019), changes in metabolic biomarkers and hormone levels during an ultramarathon include: elevated skeletal muscle, cardiac muscle, and liver enzymes; elevated creatinine and variable fluctuations in electrolyte levels; elevated leukocytes, iron, and ferritin; decreased erythrocytes; elevated inflammatory markers (C-reactive protein, erythrocyte sedimentation rate, interleukins); decreased testosterone and increases in other hormones. In addition, ultramarathon finishers seem to have a hypovolemic physiologic response during competition with lower diastolic blood pressure and lower oxygen saturation. Sodium imbalances may be seen in ultraendurance athletes. Several reviews have evaluated the effect of hydration status on ultramarathon running (Costa et al., 2014; Hoffman et al., 2019; Burke et al., 2019). Ultramarathon runners may develop varying degrees of both hypohydration and hyperhydration (with accompanying exercise associated hyponatremia), dependent on event duration, and environmental conditions. Additionally, the demand for water and electrolytes is an individual characteristic of the athlete. Proper management of hydration is critical for both performance and overall health in ultramarathon running.

Multiple studies have examined predictor variables for successful ultramarathon running performance (Knechtle and Tunda, 2015; Coates et al., 2020). In recent years, attention has been given to the effects of aging on endurance performance in runners (Knechtle et al., 2012; Lehto, 2016; Nikolaidis and Knechtle, 2020). In general, age 35–50 years, low body mass index (BMI), and low body fat are consistent predictors of better ultramarathon performance (Spittler and Oberle, 2019). Considering changes in blood morphology and chosen biochemical parameters in ultramarathon runners Jastrzębski et al. (2015) have concluded that organ damage and negative metabolic changes during a 100-km run occurred similarly in participants less experienced as well as in well trained runners.

In this study differential scanning calorimetry (DSC) has been used to assess potential alterations in the blood serum heat capacity profile during extremely demanding 12-h of running. The thermal denaturation profiles of serum proteins have been monitored before the run and immediately after finishing the ultramarathon. It has been hypothesized that DSC heat capacity profiles of blood serum proteome would be changed due to this extreme physical fatigue. The DSC technique provides valuable information about folding and binding interactions in proteins and the thermodynamic driving forces governing protein stability. It has been recently used successfully in analyzing heat capacity changes of physiological fluids (blood plasma/serum, cerebrospinal fluid, synovial fluid) to monitor various physiological responses in health and disease (Garbett et al., 2000, 2009; Michalik et al., 2010,

2013, 2018a, 2018b; Chagovets et al., 2011; Todinova et al., 2011, 2012, 2013; Fekecs et al., 2012; Mehdi et al., 2013; Barceño et al., 2015; Kikilishvili et al., 2015; Krumova et al., 2015; Kędra-Krblik et al., 2017; Tenchov et al., 2019; Wiegand et al., 2019; Antonova et al., 2020; Dandé et al., 2020; Perence, 2020). Alterations in serum protein content, changes in the protein structure, changes in protein denaturation temperature due to a ligand binding or protein-protein interactions lead to modifications of the serum heat capacity profiles detected by DSC. So, the effects of extremely demanding physical activity during ultramarathon running should be reflected in serum DSC profiles.

2. Materials and methods

2.1. Participants

Ten male amateur long-distance runners (mean age 52.0 ± 6.2 years, body height 176.9 ± 4.9 cm, body mass 73.9 ± 6.0 kg, weekly covered distance 57.4 ± 22.9 km, training history 7.3 ± 2.2 years) were recruited from participants in a 12-hr race organized by the Municipal Sports and Recreation Center and the recreation and sports club TKS "Jastrzęb" in Ruda Śląska (Poland). All runners were non-smokers and did not intend to use non-steroidal analgesics before and during the race. They completed a questionnaire on their medical and training history and signed informed consent to participate in the study after being informed about the experimental procedures. The study protocol conformed to the ethical guidelines of the World Medical Association Declaration of Helsinki and was approved by the Ethics Committee of the Jerzy Kukuczka Academy of Physical Education in Katowice (Poland).

2.2. Study protocol

The run took place between 7 a.m. and 7 p.m., on April 26, 2018, in the town of Ruda Śląska. The contestants were required to cover a circular route of 1.6 km as many times as they could. The average distance covered was 94.73 ± 12.97 km with an average speed 7.9 ± 1.1 km h⁻¹. The ambient temperature was 24 ± 4 °C and relative humidity $46 \pm 2\%$. The runners ingested carbohydrate-rich food (sandwiches, cookies, fruits, and carbohydrate energy bars) every 90–120 min and fluids (water and sport beverages) every 20–25 min during the run.

2.3. Blood serum samples

Blood samples were obtained 1 h before the running (pre-run) and immediately after finishing the 12-h running (post-run) into tubes for separation of serum (BD Vacutainer™ Serum Tube, UK) and then they were allowed to stand for 30 min for blood to clot before serum was separated. Serum was stored frozen for analysis at -20 °C for a period shorter than one month without unfreezing and freezing. Total protein content was assayed using the biuret method (Randox Laboratories, UK) by means of the Hitachi 917 Modular P analyzer.

For DSC experiment, serum samples were diluted 20-fold with distilled degassed water. The pH value of the diluted samples was within the range 6.5–7.0.

2.4. Differential scanning calorimetry

DSC measurements were performed using the VP DSC MicroCal instrument (Northampton, MA) in the temperature range of 20 – 100 °C with the heating rate 1 °C min⁻¹. A constant pressure of about $1.7 \cdot 10^5$ Pa was exerted on the liquids in the cells. Duplicate scans for each sample were collected. The calorimetric data were corrected for the instrumental baseline water–water. DSC curves were normalized for the gram mass of protein and next a linear baseline was subtracted. An apparent excess heat capacity C_p^{ex} (J °C⁻¹ g⁻¹) versus temperature (°C) has been plotted.

The following parameters of the observed endothermic transition

have been determined: the temperature and excess heat capacity at maximum (T_m , $C_{p,m}$), the enthalpy (ΔH) of serum denaturation (calculated as the area under the endothermic peak, expressed in $J\ g^{-1}$), the width of peak in its half height (HHW) and T_{FM} (the first moment of the thermal transition with respect to the temperature axis (the formula is given e.g. in (Michnik et al., 2010; Michnik et al., 2013)).

2.5. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the Statistica 13 software. For all measures, descriptive statistics were calculated. The Shapiro–Wilk test was used to check the normality of distributions of the studied variables. Student t-test was used to compare mean values of parameters of thermal denaturation transition before and after the ultramarathon running. Pearson's correlation coefficient (r) was found to describe the relationships between the age of the participants, covered distance, speed, and serum thermal transition parameters. The level of significance was set at $p < 0.05$.

3. Results

Fig. 1 shows the mean DSC curves of blood serum collected from amateur long-distance runners before and after ultramarathon. The complex endothermic transition observed on the serum DSC curve in the temperature range 40–90 °C comes from denaturation of serum proteins. Assuming there are no significant interactions between the serum proteins, this transition is the sum of thermal transitions of the individual proteins weighted according to their mass in solution (Garbett et al., 2005). For healthy people, DSC profiles made under the same physicochemical and experimental conditions are similar. The typical calorimetric profile of serum in aqueous solution usually exhibits 3–4 local maxima (Michnik et al., 2013, 2019, 2020a, 2020b; Duch et al., 2019, 2020). The first peak (or shoulder), at about 50 °C, represents mainly a non-ligated form of albumin, the most abundant serum protein. The second peak at about 62 °C (sometimes invisible) has its source in the denaturation of haptoglobin, the acute phase protein belonging to the alpha-2 globulin fraction. The third peak at about 70 °C, frequently the most intense, represents mainly the contributions from denaturation of immunoglobulins. At about 83 °C the fourth peak (or shoulder) is sometimes visible. It represents contributions from the C13 domain of immunoglobulin IgG1 and/or transferrin (Garbett, 2009).

The shape of serum DSC profile visible in Fig. 1 for ultramarathon runners before the run has the characteristics of a profile observed for healthy people. The comparison of DSC curves of sera before and after finishing the 12-h ultramarathon running clearly shows significant

differences. The transition shifts towards higher temperatures and its shape changes due to the great effort during a long, exhausting run. The decrease in the intensity of the transition in the low-temperature range may indicate a decrease of non-ligated form of albumin. The local maximum at about 62 °C is no longer visible, which may suggest a drop in haptoglobin levels. Outlining exothermic transition above 90 °C on the pre-run profile is not visible in DSC curve after the run. Such exothermic contribution suggests the occurrence of the process of aggregation of denatured proteins in this high temperature range.

The parameters describing the endothermic transition of serum denaturation are shown in Table 1. Statistically significant differences between “pre-run” and “post-run” stages have been found for the temperature T_m ($p = 0.0003$) and excess heat capacity at maximum $C_{p,m}$ ($p = 0.00004$), the enthalpy of serum denaturation ΔH ($p = 0.04$) and the first moment temperature TFM ($p = 0.00006$). The mean values of all these parameters are higher after the run. Contrary, a width of peak in its half height (HHW) decreases, but the difference between mean values of HHW in both stages is not statistically significant ($p = 0.09$).

Data presented in the current study refer to amateurs, which constitute a widely heterogeneous group in terms of general lifestyle and individual, not professionally designed training regimens. The Fig. 2 and shows the diversity of responses of ultramarathon participants to the 12-h run. Serum DSC curves before and after the run have been compared for the exemplary 4 participants.

Fig. 2a represents the set of DSC curves obtained for the 52-year-old runner who ran the longest distance (114 km) and had the highest average speed ($9.5\ km\ h^{-1}$) from among all participants. Fig. 2b shows the curves for the oldest participant (63 years old) who ran 97 km with the average speed $8.1\ km\ h^{-1}$. The curves shown in Fig. 2c correspond to the 49-year-old runner who covered a similar distance to a) (111 km) with the average speed $9.2\ km\ h^{-1}$. The distance covered in 12 h by a 51-year-old runner, for whom the curves are presented in Fig. 2d, was 85 km and the average speed $7.0\ km\ h^{-1}$.

The heterogeneity of our runners and the small sample size makes it impossible to find a relationship between the intensity of the observed changes in the parameters of the serum denaturation transition and the distance covered. Positive correlation between the average speed and the difference in $C_{p,m}$ value has been suggested by Pearson's correlation coefficient ($r = 0.6$; $p = 0.1$). Statistically significant correlations have been found only between the age and the pre-run values of T_m ($r = 0.65$; $p = 0.04$) and HHW ($r = 0.82$; $p = 0.006$). Additionally, the age of the participant has appeared negatively correlated with differences between “pre-run” and “post-run” stages in the enthalpy of serum denaturation ($r = -0.82$; $p = 0.006$) and in HHW values ($r = -0.79$; $p = 0.01$).

4. Discussion

In the present study, DSC method has been used to evaluate the effect of the ultramarathon running on participant's blood serum. DSC allows to generate unique signatures for serum/plasma samples, which can be used for diagnostic purposes and for monitoring the stage of the disease or treatment efficacy (Garbett et al., 2000, 2009; Michnik et al., 2010, 2011; Chagovetz et al., 2011; Todorova et al., 2011, 2012, 2013; Fekete et al., 2012; Mehdi et al., 2013; Baccelló et al., 2013; Kiliashvili et al., 2013; Krumsa et al., 2015; Kpaka-Kodlik et al., 2017; Trenchov et al., 2019; Wierand et al., 2019; Antimova et al., 2020; Dandé et al., 2020).

Table 1
Mean ($\pm$ SD) parameters of serum DSC transition.

Stage	T_m /°C	$C_{p,m}$ /J g ⁻¹ °C ⁻¹	ΔH /J g ⁻¹	HHW/°C	TFM/°C
pre-run	70.9 $\pm$ 0.9	0.859 $\pm$ 0.201	10.55 $\pm$ 8.32	25 $\pm$ 6	67.0 $\pm$ 2.1
post-run	75.8 $\pm$ 2.9	1.102 $\pm$ 0.226	22.08 $\pm$ 5.61	19 $\pm$ 3	72.6 $\pm$ 2.1

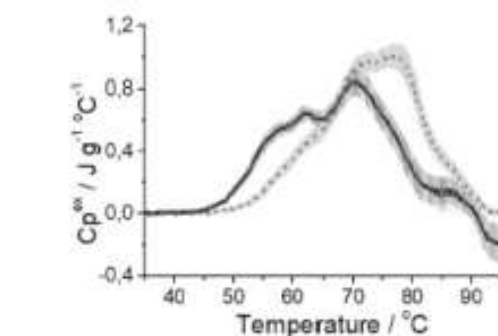


Fig. 1. Mean DSC curves of serum before (solid black line) and after ultramarathon running (dotted red line); the shaded area is the standard error of the mean (SEM) at each temperature (gray for “pre-run”, cyan for “post-run”). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

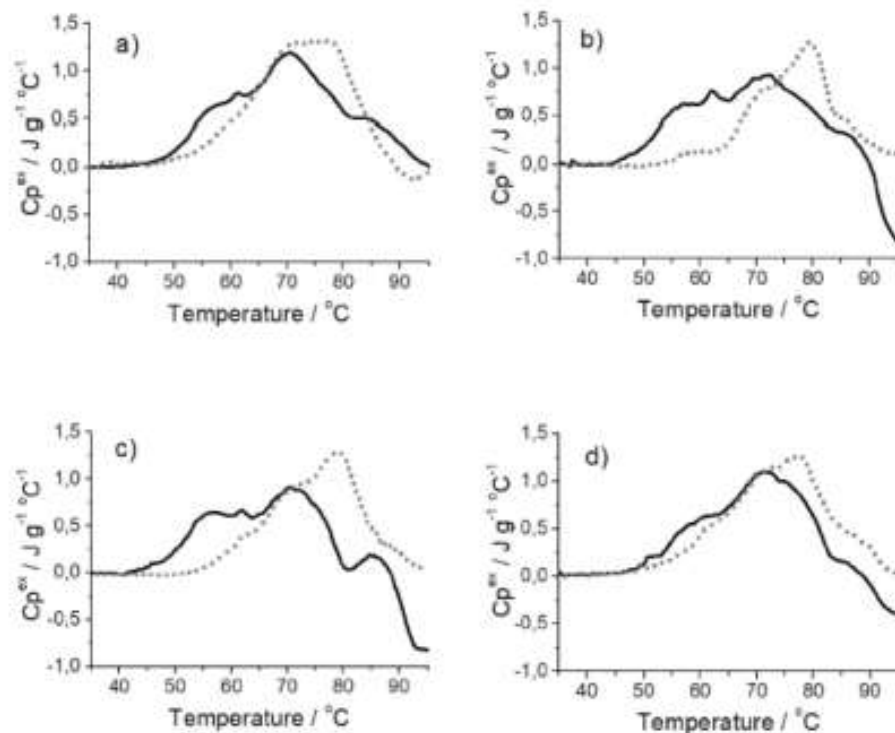


Fig. 2. Serum DSC curves before (solid black line) and after (dot red line) the 12-h run for selected examples of 4 participants. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

Ferreira and Litvinov, 2020). Although the complex endothermic DSC transition observed for serum solution arises from the denaturation of the constituent proteins, this method does not rely on identification of the components within serum, rather it relies on the overall DSC pattern generated by a clinical sample of interest. The shape of DSC curves is sensitive to protein structure modifications, protein-protein interactions, and various ligand binding to a protein. The specific biomarkers present in serum in the disease state, or in conditions of disturbed equilibrium of the body for other reasons, can modify the serum thermal denaturation profile. The source of such biomarkers can be biochemical and physiological processes resulting from racing. It has been shown, for example, that endurance exercise evokes transient increases in certain cardiac biomarkers (Schachag et al., 2008; Zelazowska et al., 2019; Martinez-Navarro et al., 2019). Various blood and urine biomarkers after an ultra-distance race have been compared to their respective baseline levels by Joubert et al. (2019). We assume that medical consequences of long-term endurance running training and competition should be reflected in the DSC profiles of the sera.

The main findings of this study are significant changes in blood serum DSC profiles of amateur ultramarathon runners immediately after finishing the 12-h running. They are associated with significant changes in the serum proteome and reflect a physiological response to a state of acute stress and volume overload. Ultra-endurance events exert a huge impact on metabolism and energy balance. It seems probable that excessive amounts of intramuscular proteins and metabolic products may be released into the blood stream due to an enhanced metabolism. Hoppel et al. (2019) suggest impaired kidney function in most of the non-elite ultramarathon runners immediately post-race. Ultra-distance races have been shown to increase the accumulation of nitrotyrosine and protein carbamyl in serum and urine, thereby suggesting the induction

of oxidative stress induced by extreme physical exercise (Levey et al., 2005). Generally, it is accepted that strenuous physical exercise can induce oxidative stress in humans, enhances oxygen consumption and production of reactive oxygen species (Mastaloudis et al., 2001; Imai et al., 2002; Finaud et al., 2006; Lamprecht et al., 2006; Park and Kwak, 2018). However, it is difficult to establish to what extent our results can be explained by oxidative protein modification connected with the stress of exercise.

The changes observed in the shape as well as in parameters of serum denaturation transition after 12 h ultramarathon running are similar but much stronger than those reported by us earlier for elite cross-country skiers after exercise (Michniuk et al., 2020b). Those previous studies also stated an increase of T_{10} , C_{p10} , $T_{1/2}$ and a decrease of HHW after exercise compared to before exercise stage. These post-exercise effects have been enhanced by sauna treatments (Duch et al., 2020; Michniuk et al., 2020a). A shift of the endothermic transition towards higher temperatures was also observed during the aging of serum solutions (Gielhoj et al., 2019). However, during the aging process, the presence of the exothermic peak has been additionally observed in the temperature range preceding the endothermic transition. We did not observe such an effect in the present study.

Despite the fact that the endothermic transition associated with serum denaturation is generated by the whole serum proteome, it seems obvious that the changes observed in DSC profiles of athlete's blood serum should be largely related to the predominant serum protein, albumin. This protein possesses a unique capability to bind, covalently or reversibly, a great number of various endogenous and exogenous compounds. The ability to fluctuate between isomeric forms in aqueous solution could assist in adapting the albumin molecule to bind ligands with a diverse nature with high affinity (Kragh-Hansen, 1990). Both in

the blood and in extravascular fluids albumin is susceptible to different oxidative modifications, especially thiol oxidation and carbonylation. Ligand binding and the oxidation of albumin alter its structure. Conformation differences between various forms of albumin (e.g. reduced (human mercaptalbumin, HMA) oxidized (human non-mercaptalbumin, HNA), non-ligated, with bound fatty acids or other ligands, glycosylated) lead to differences between their DSC profiles. An increasing fraction of albumin carrying different ligands could at least partly explain the upward shift of the endothermic transition observed after the ultramarathon running, since the ligated form of albumin has a higher thermal stability than non-ligated (Michnik et al., 2006; Musznik et al., 2006; Garidel et al., 2009; Michnik and Drzanga, 2010; Minami et al., 2014; Behloul et al., 2014). The effects of altered carbohydrate metabolism, the regulation of substrate metabolism, protein degradation, an increase in oxygen demand during prolonged exercise affect the state of albumin. Spanidis et al. (2017) examined the oxidation of human serum albumin caused by oxidative stress following an ultramarathon race. They reported that HGA oxidation after ultramarathon race exhibited a great variation between different athletes.

Generally, the thermal transitions observed for serum/plasma of individuals suffering from various diseases have been found significantly shifted towards higher denaturation temperatures when compared with healthy controls. According to Hoffman and Krishnan (2014) study of 1212 active ultramarathon runners, they appear healthier, compared with the general population. However, intense endurance training before the ultramarathon may result in the accumulation of fatigue already at this stage. The mean value of the first moment temperature T_{FM} (about 67 °C) for participants of this study before the run is similar for that found by us earlier for cross country skiers (Michnik et al., 2020a) and slightly higher than the value reported for other group of athletes (Michnik et al., 2013). The pre-run value of T_{FM} has been found significantly correlated with the age of the participant in the current study. A positive value of the Pearson's correlation coefficient ($r = 0.65$) indicates an increase in pre-run T_{FM} value with age. The value of T_{FM} increases significantly to 72.6 °C after the run. Ultramarathon running, being one of the most extreme and strenuous types of exercise, represents a major physical challenge even for elite athletes. The question remains about its safety for amateur runners. Participants of current study were non-elite runners with large inter-individual performance differences. Amateurs may be more prone to developing adverse effects of a long-term high-intensity stimulus compared to elite athletes. On the other hand, results of Jastrzebski et al. (2015) study have indicated that organ damage and negative metabolic changes during a 100-km run occur similarly in participants less experienced as well as in well trained runners and are independent of their age. The similar conclusion can be drawn from the comparison of the DSC curves shown in Fig. 3b and c for 63- and 49-years old participants, respectively. In both cases, despite the difference in the age of runners, the changes connected with the 12-h running are large. However, the results of current study suggest smaller differences between "pre-run" and "post-run" stages in the enthalpy of serum denaturation and in the width of the thermal transition with age.

This study has a few limitations worth noting. Firstly, it was conducted on a relatively small group including male subjects only. Therefore, we are not able to discuss possible gender differences. Secondly, the observation time was limited to pre- and post-running. We did not monitor the changes in serum DSC curves during and at the end of the recovery phase. Therefore, we did not observe whether and how quickly the values of the parameters describing the analyzed denaturation transition return to pre-race values. Such information on the recovery time would be valuable, and the DSC method ideally suited to obtain it. However, we did not have serum samples from this period.

5. Conclusions

This study is probably the first to investigate the effects of

ultramarathon running using the differential scanning calorimetry method. The results of the DSC study showed that the 12-h running race led to significant changes in the serum proteome of participants. A clear influence of the ultramarathon run on the shape and parameters of the endothermic transition resulting from the denaturation of serum proteins was observed in all participants, who were amateur long-distance runners. The direction of changes was the same, but a large variation in the size of the effect was found due to large interindividual performance differences. The small sample size and the heterogeneity of amateur runners made it impossible to find a relationship between the intensity of the observed changes and the age of the participant and the distance covered.

Author contributions

Conceptualization, A.M. and E.S.-K.; Formal analysis, A.M.; Investigation, A.M., A.K., K.D., E.S.-K., S.B.; Methodology, A.M. and E.S.-K.; Resources, A.M. and E.S.-K.; Visualization, A.M., A.K., K.D., S.B.; Writing-original draft, A.M.; Writing-review & editing, A.M., E.S.-K., A.K., K.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding

This research received no external funding.

Declaration of competing interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Antkowiak, B., Naylor, E., Kojima, R., Tamasova-Yusuf, K., Tachibana, S., 2020. Endothermic transitions in the heat capacity profiles of human cerebrospinal fluid. *Biophys. J.* 118, 231–238. <https://doi.org/10.1007/s00049-020-01439-9>.
- Bacelo, P., Costa, J.J., Oliveira, A., Juncos-Marco, T., Durán, M.A., Nova, A., Roa, T., Sampaio, A., Portugal, J., 2015. Characterization of monoclonal gammopathy of undetermined significance by calorimetric analysis of blood serum proteome. *PLoS One* 10 (3), e0120316. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120316>.
- Bollioli, M., Moevari-Movahedi, A.A., Chaffari-Moghaddam, M., Gabor, A.A., Khajeh, M., Najafi, S., Pourmohammadi, N., Taghavi, P., Pourmohammadi, N., Sanchooli, M., Banaei-Sadr, S., Naderi, M., Shalusi, S., 2014. Comparative study of thermal denaturation of glycosylated and non-glycosylated human serum albumin. *Thermochim. Acta* 594, 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2014.06.004>.
- Burke, L.M., Castell, L.M., Coia, D.J., Close, G.L., Costa, R.J.S., Mellin, A.K., Dyke, J., Debbrow, B., Peeling, P., Witard, O.G., Halson, S.L., Saunders, P.U., Benson, S., Liu, D.M., Slater, G.J., Stellingwerff, T., 2019. International association of athletics federations consensus statement 2019: nutrition for athletes. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metabol.* 29, 73–94. <https://doi.org/10.1123/ijsnem.2019-0068>.
- Chagovets, A.A., Jensen, R.L., Racht, L., Glantz, M., Chagovets, A.M., 2011. Preliminary use of differential scanning calorimetry of cerebrospinal fluid for the diagnosis of glioblastoma multiforme. *J. Neuro Oncol.* 105 (3), 499–506. <https://doi.org/10.1007/s11060-011-0630-5>.
- Costa, A.M., Bernard, J.A., King, T.J., Burr, J.F., 2020. Physiological Determinants of Ultramarathon Trail Running Performance. <https://doi.org/10.31233/osf.io/yf4h8>.
- Costa, R.J.S., Gill, S.R., Hawley, J., Wright, A., Maccubbin, S., 2014. Perturbed energy balance and hydration status in ultra-endurance runners during a 24 h ultramarathon. *Br. J. Nutr.* 112, 428–437. <https://doi.org/10.1017/S0007114514000907>.
- Dankó, A., Kocsis, B., Lőrinczy, D., 2020. Thermal analysis of synovial fluids in different stages of osteoarthritis and after bacterial infections. *J. Therm. Anal. Calorim.* <https://doi.org/10.1007/s10973-019-09233-4>.
- Duch, R., Michnik, A., Pokorska, I., Sadowska-Jędrzej, E., 2020. Modification of blood serum DSC profiles by stress treatments in cross-country skiers during the exercise cycle. *J. Therm. Anal. Calorim.* 142, 1927–1932. <https://doi.org/10.1007/s10973-020-10163-7>.
- Duch, R., Michnik, A., Pokorska, I., Sadowska-Jędrzej, E., Hefl, A., 2019. Whole-body cryostimulation impact on blood serum thermal denaturation profiles of cross-country skiers. *J. Therm. Anal. Calorim.* 136, 4505–4511. <https://doi.org/10.1007/s10973-019-08766-8>.
- Pekala, T., Espi, I., Portant, A., Lőrinczy, D., 2012. Differential scanning calorimetry (DSC) analysis of human plasma in melanoma patients with or without regional lymph node metastases. *J. Therm. Anal. Calorim.* 100 (1), 149–152. <https://doi.org/10.1007/s10973-011-1000-6>.

- Feenstra, A., Lőrinczy, D., 2020. Surgical stress detection in human blood plasma by DGC. *J. Therm. Anal. Calorim.* 142, 753–758. <https://doi.org/10.1007/s10973-020-09513-w>.
- Finad, J., Lai, G., Filaret, E., 2006. Oxidative stress: relationship with exercise and training. *Sports Med.* 36, 327–350. <https://doi.org/10.2165/00007256-200636040-00004>.
- Garbett, N.C., Melnyk, C.S., Helm, C.W., Jensen, A.B., Chaires, J.B., 2009. Differential scanning calorimetry of blood plasma for clinical diagnosis and monitoring. *Exp. Mol. Pathol.* 36, 186–191. <https://doi.org/10.1016/j.yesmp.2008.12.001>.
- Garbett, N.C., Miller, J.J., Jensen, A.B., Chaires, J.B., 2000. Calorimetry outside the box: a new window into the plasma proteome. *Biophys. J.* 79, 1377–1383. <https://doi.org/10.1021/biophysj.107.119453>.
- Gratid, P., Hoffmann, C., Blume, A., 2009. A thermodynamic analysis of the binding interaction between polystyrene 20 and 50 with human serum albumin and immunoglobulin: a contribution to understand colloidal protein stabilization. *Biophys. Chem.* 143, 70–78. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2009.04.004>.
- Hoffman, M.D., 2016. Injuries and health considerations in ultramarathon runners. *Phys. Med. Rehabil.* 37 (1), 203–216. <https://doi.org/10.1016/j.pmr.2013.01.004>.
- Hoffman, M.D., Krishnan, R., 2014. Health and exercise-related medical issues among 1,212 ultramarathon runners: baseline findings from the Ultrarunner Longitudinal Tracking (ULTRA) Study. *PLoS One* 9 (1), e83567. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083567>.
- Hoffman, M.D., Parentak, A., Rogers, I.R., Khoshdel, M., Hill, J.C., Townes, D.A., Scheer, B.V., Krashinsky, B.J., Baizer, P., Lipman, G.S., 2014. Medical services at ultra-endurance foot races in remote environments: medical issues and consensus guidelines. *Sports Med.* 44 (8), 1055–1069. <https://doi.org/10.1007/s40229-014-0109-3>.
- Hoffman, M.D., Stellingwerff, T., Costa, R.J.S., 2019. Considerations for ultra-endurance activities: part 2: hydration. *Res. Sports Med.* 27, 182–194. <https://doi.org/10.1080/15438627.2019.1582199>.
- Hoppel, P., Calabrese, E., Festa, D., Kanmer-Ramplstaal, W., Onaiger, E., Bortolotto, M., 2019. Physiological and pathophysiological responses to ultramarathon running in non-elite runners. *Front. Physiol.* 10, 1300. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01300>.
- Inoue, H., Hayashi, T., Negawa, T., Nakamura, K., Tomita, M., Koda, K., Tajima, T., Koda, Y., Suda, K., Ito, S., 2002. Strenuous exercise-induced change in redox state of human serum albumin during intensive kendo training. *Jpn. J. Physiol.* 52, 135–40. <https://doi.org/10.2170/jipysiol.52.135>.
- Janković, Z., Sychowska, M., Janković, M., Frust, K., Krystof, Frust, Katarzyna, Korta, J., Radziwiłł, W., Kuczyńska, A., Radziwiłł, E., 2015. Changes in blood morphology and chosen biochemical parameters in ultra-marathon runners during a 100-km run in relation to the age and speed of runners. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health* 28, 501–514. <https://doi.org/10.1080/10902308.2015.106610>.
- Jouffroy, R., Lebrun, X., Marnett, N., Anglicheau, D., 2019. Acute kidney injury during an ultra-distance race. *PLoS One* 14 (9), e0222544. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222544>.
- Kan, W.F., Hou, S.H., Chin, Y.H., Chou, S.L., Kuo, F.C., Wang, S.H., Chen, J.J., 2015. Effects of 100-km ultramarathon on acute kidney injury. *Clin. J. Sport Med.* 25 (1), 49–54. <https://doi.org/10.1097/JSM.0000000000000116>.
- Kapra-Enik, K., Chmielewska, I., Michniuk, A., Zarzycki, P., 2017. Blood serum calorimetry indicates the chemotherapeutic efficacy in lung cancer treatment. *Sci. Rep.* 7, 16796. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17004-z>.
- Kiebon, A., Michniuk, A., Polaczek, G., Kuch, K., Szalowska-Furga, E., 2019. Differential scanning calorimetry of human blood serum exposed in vitro to X-ray radiation. *Thermochim. Acta* 650, 173353. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2019.173353>.
- Kilbadi, L., Ramiah, M., Namasani, G., Leskiva, T., Kuvova, P., Gargashide, M., Kikuchi, M., Monastir, J., 2015. Thermal stability of blood plasma proteins of breast cancer patients: DSC study. *J. Therm. Anal. Calorim.* 120 (1), 501–505. <https://doi.org/10.1007/s10973-015-4438-2>.
- Klapinska, B., Waskiewicz, Z., Chruszka, S.J., Szalowska-Furga, E., Czuba, M., Langfort, J., 2013. Metabolic responses to a 48-h ultra-marathon run in middle-aged male amateur runners. *Eur. J. Appl. Physiol.* 113 (11), 2781–2793. <https://doi.org/10.1007/s00421-013-2714-8>.
- Knecht, B., 2017. Ultramarathon running: medical issues. In: *Palati, F. (Ed.), Extreme Sports Medicine*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-52265-7_13.
- Knecht, B., Nilsen, P., 2015. Ultra-marathon running. *Dutch Sportsmedicine* 18 (4), 6–10.
- Knecht, B., Nilsen, P.T., 2015. Physiology and pathophysiology in ultra-marathon running. *Front. Physiol.* 6, 634. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00634>.
- Knecht, B., Riet, C.A., Roelmann, T., Lepers, R., 2012. Age-related changes in 100-km ultra-marathon running performance. *Age (Oxford)* 34 (4), 1035–1045. <https://doi.org/10.1007/s11367-011-9290-9>.
- Knecht, B., Taula, O., 2015. Effects of training and anthropometric factors on marathon and 100 km ultramarathon race performance. *Open Access J. Sports Med.* 129. <https://doi.org/10.2147/oajsm.2015.00637>.
- King-Hansen, U., 1990. Structure and ligand binding properties of human serum albumin. *Drug Metab. Rev.* 22 (1), 87–94.
- Kruseva, S., Yodanis, S., Danailova, A., Pedova, V., Dimitrova, R., Gancheva, L., Tanova, S.C., 2015. Calorimetric features of IgM gammopathies: implication for patient's diagnosis and monitoring. *Thermochim. Acta* 615, 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2015.07.003>.
- Lamprecht, M., Griebel, J.F., Schwab, G., Hofmann, P., Oertl, K., 2006. Single bout of exercise affect albumin redox state and carbonyl groups on plasma protein of trained men in a workload-dependent manner. *J. Appl. Physiol.* 104, 1611–1617. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01329.2007>.
- Lehto, N., 2016. Effects of age on marathon finishing time among male amateur runners in Stockholm Marathon 1979–2014. *J. Sport Health Sci.* 5 (3), 349–354. <https://doi.org/10.1016/j.jshs.2015.01.006>.
- Levey, A.S., Eckardt, K.U., Tolkachev, Y., Levin, A., Corcos, J., Ravid, J., De Zeeuw, D., Himmelfarb, T.H., Lameire, N., Eknoyan, G., Willis, K., 2006. Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int.* 67 (6), 2089–2100. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2005.00365.x>.
- Martinez-Navarro, I., Sanchez-Gómez, J.M., Aparicio, I., Priego-Quesada, J.I., Priego-Soriano, P., Collado, E., Hernandez, B., Hernandez, C., 2020. Effect of mountain ultramarathon distance competition on biochemical variables, respiratory and lower-limb fatigue. *PLoS One* 15 (9), e0230046. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230046>.
- Martinez-Navarro, I., Sanchez-Gómez, J.M., Collado-Buira, E.J., Hernandez, B., Pardo, N., Hernandez, C., 2019. Cardiac damage biomarkers and heart rate variability following a 112-h mountain race: relationship with performance and recovery. *J. Sports Sci.* 37, 813–822.
- Mastalowski, A., Leonard, S.W., Traher, M.O., 2001. Oxidative stress in athletes during extreme endurance exercise. *Free Radic. Biol. Med.* 31, 911–922. [https://doi.org/10.1016/S0891-5848\(01\)00667-6](https://doi.org/10.1016/S0891-5848(01)00667-6).
- Mehdi, M., Polaczek, G., Zarzycki, P., Feenstra, A., Lőrinczy, D., 2013. Differential scanning calorimetry (DSC) analysis of human plasma in different postnatal stages. *J. Therm. Anal. Calorim.* 111 (2), 1001–1004. <https://doi.org/10.1007/s10973-013-2460-2>.
- Michniuk, A., Denzaga, Z., 2010. Thermal denaturation of mixtures of human serum proteins: DSC study. In: *J. Therm. Anal. Calorim.*, 101, pp. 513–518. <https://doi.org/10.1007/s10973-010-0626-5>.
- Michniuk, A., Denzaga, Z., Michniuk, K., Zarzycki, P., Sannur, I., Sotakova, E., Pleschke, W., 2010. Differential scanning calorimetry study of blood serum in chronic obstructive pulmonary disease. *J. Therm. Anal. Calorim.* 102, 57–60. <https://doi.org/10.1007/s10973-009-0802-6>.
- Michniuk, A., Denzaga, Z., Popręcki, S., Czuba, M., Kempa, K., Szalowska-Furga, E., 2013. DSC serum profiles of athletes. In: *J. Therm. Anal. Calorim.*, 113, pp. 365–370. <https://doi.org/10.1007/s10973-013-3130-3>.
- Michniuk, A., Denzaga, Z., Schuler, I., Popręcki, S., Czuba, M., 2013a. Diversity in athlete's response to strength effort in normobaric hypoxia: serum DSC study. *J. Therm. Anal. Calorim.* 134, 633–641. <https://doi.org/10.1007/s10973-013-7087-4>.
- Michniuk, A., Duch, K., Polaczek, G., Szalowska-Furga, E., 2020a. Differences in cryoprotection and stress effects on post-exercise changes in blood serum of athletes. *Compl. Ther. Med.* 51, 102453. <https://doi.org/10.1016/j.ctim.2020.102453>.
- Michniuk, A., Michniuk, K., Kuzewska, A., Denzaga, Z., 2006. Comparative DSC study of human and bovine serum albumin. *J. Therm. Anal. Calorim.* 84, 113–117. <https://doi.org/10.1007/s10973-005-7179-1>.
- Michniuk, A., Polaczek, G., Duch, K., Szalowska-Furga, E., 2020b. Differential scanning calorimetry reveals that whole-body cryoprotection in cross-country skiers can modify their response to physical effort. *J. Therm. Anal. Calorim.* <https://doi.org/10.1007/s10973-020-09230-2>.
- Michniuk, A., Szalowska-Furga, E., Cholewa, J., Schuler, I., Kiebon, A., Denzaga, Z., 2013b. Differential scanning calorimetry study of early and advanced stages in Parkinson's disease using human blood serum. *Thermochim. Acta* 662, 64–69. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2013.02.014>.
- Minami, T., Terada, F., Takahashi, T., Aikawa, H., Matsumura, Y., Nishi, K., Ito, G., 2014. Comparative studies on the heterogeneity of plasma-derived and recombinant human albumin in laboratory use. *Int. J. Biol. Macromol.* 69, 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomac.2014.05.016>.
- Muscare, L., Brusch, M., Casilano, G., Petrucci, A., Duni, N., Boccia, P., Del, Urbani, A., Rialdi, G., Chiggiari, C.M., 2006. Characterization of oxidation end product of plasma albumin "in vivo". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 349, 665–673. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.06.079>.
- Nilsen, P.T., Knecht, B., 2020. Performance in 100-km ultramarathons at which age, it reaches its peak? *J. Strength Cond. Res.* 34 (3), 1409–1413. <https://doi.org/10.1519/JSC.0000000000002209>.
- Park, S.-Y., Kwak, Y.-S., 2016. Impact of aerobic and anaerobic exercise training on oxidative stress and antioxidant defense in athletes. *J. Exerc. Rehabil.* 12 (2), 115–119. <https://doi.org/10.12965/jer.1602005.299>.
- Rodrigues Júnior, J.F.C., Molinari, E., Amorim, P.F., Da Costa Sena, A.P., Mendes, T.T., Venesoni, C.E., Torres Cabido, C.E., Gervilho De Oliveira Júnior, M.N., 2020. Thermoregulatory and metabolic responses to a half-marathon run in hot, humid conditions. *J. Therm. Biol.* 95, 102734. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2020.102734>.
- Scharlag, J., George, K., Garve, R., Uthman, A., Hindermann, W., 2006. Exercise-associated increases in cardiac biomarkers. *Med. Sci. Sports Exerc.* 40, 1400–1415. <https://doi.org/10.1249/00005768-200604010-01726>.
- Scheer, V., Baizer, P., Giovannelli, N., Vermile, G., Millet, G.P., Costa, R.J.S., 2020. Defining off-road running: a position statement from the ultra sports science foundation. *Int. J. Sports Med.* 41, 275–284. <https://doi.org/10.1055/a-1096-0930>.
- Spaniol, Y., Piffiez, A., Stager, D., Szaradimon, O.A., Leonidas, D.D., Spaniol, D.A., Tzavara, A.M., Kourou, D., 2017. Oxidation of human serum albumin exhibits inter-individual variability after an ultra-marathon mountain race. *Exp. Ther. Med.* 13, 2302–2306. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4260>.
- Spindler, J., Oberle, L., 2019. Current trends in ultramarathon running. *Curr. Sports Med. Rep.* 18 (11), 307–309. <https://doi.org/10.1249/JSR.0000000000000054>.
- Tenchov, B., Koyanova, R., Antonova, S., Abazova, S., Tenechev, Z., Kozova-Penkova, R., Monchilova, A., 2019. Blood plasma thermal behavior and protein oxidation as indicators of multiple sclerosis clinical status and plasma

- exchange therapy progression. *Thermochim. Acta* 671, 193–199. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2018.12.001>.
- Tiller, N.S., 2019. Pulmonary and respiratory muscle function in response to marathon and ultra-marathon running: a review. *Sports Med.* 49 (7), 1031–1041. <https://doi.org/10.1007/s40279-019-01105-w>.
- Todinova, Z., Krumova, S., Danailova, A., Pedova, V., Gueorgieva, M., Mikhaylov, O., Gancheva, L., Taneva, S.G., 2018. Calorimetric studies for monitoring of multiple myeloma and Waldenström's macroglobulinemia patients. *Eur. Biophys. J.* 53, 7992–7998. <https://doi.org/10.1007/s00249-018-1277-5>.
- Todinova, Z., Krumova, S., Gancheva, L., Robert, C., Taneva, S.G., 2011. Microcalorimetry of blood serum proteome: a modified interaction network in the multiple myeloma case. *Anal. Chem.* <https://doi.org/10.1021/acs.2020055>.
- Todinova, Z., Krumova, S., Kurev, P., Dimitrov, V., Djorgov, L., Danailov, Z., Taneva, S.G., 2012. Calorimetry-based profiling of blood plasma from colorectal cancer patients. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1820, 1879–1885. <https://doi.org/10.1016/j.bogen.2012.06.061>.
- Waskiewicz, Z., Kasparska, B., Szolowska-Wegga, E., Czuba, M., Kozupa, K., Kimsa, E., Derasinski, D., 2012. Acute metabolic responses to a 24-h ultra-marathon race in male amateur runners. *Eur. J. Appl. Physiol.* 112 (5), 1679–1685. <https://doi.org/10.1007/s00421-011-2135-5>.
- Waskiewicz, Z., Nikolaidis, P.T., Chalabae, A., Rosemann, T., Knechtle, B., 2019. Motivation in ultra-marathon runners. *Psychol. Res. Behav. Manag.* 12, 31–37. <https://doi.org/10.2147/PRBM.S100061>.
- Wiegand, N., Bücs, O., Dandl, A., Lönnberg, D., 2018. Investigation of protein content of synovial fluids with DCC in different arthritides. *J. Therm. Anal. Calorim.* 138, 4497–4503. <https://doi.org/10.1007/s10973-019-05151-5>.
- Zebrowska, A., Waskiewicz, Z., Nikolaidis, P.T., Mihalajczyk, R., Kawecki, D., Rosemann, T., Knechtle, B., 2019. Acute responses of novel cardiac biomarkers to a 24-h ultra-marathon. *J. Clin. Med.* 8, 87. <https://doi.org/10.3390/jcm8010087>.

Anna Michnik

Chorzów, 01.06.2022

Instytut Fizyki, Uniwersytet Śląski

ul. 75 Pułku Piechoty 1a, 41-500 Chorzów

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:
Michnik A, Sadowska-Krępa E, Kielboń A, Duch K, Bańkowski S, *Blood serum denaturation profile examined by differential scanning calorimetry reflects the effort put into ultramarathon by amateur long-distance runners*, in: *Journal of Thermal Biology*, vol. 99, Elsevier, DOI 10.1016/j.jtherbio.2021.103013, ISSN 0306-4565, 2021, 103013, mój udział polegał na: stworzeniu koncepcji publikacji, nadzorowaniu oraz wykonaniu części badań DSC, czynnym udziale w opracowaniu i analizie wyników, napisaniu i edycji manuskryptu.


.....
Podpis

Ewa Sadowska-Krępa

Chorzów, 01.06.2022

Katedra Nauk Fizjologicznych i Medycznych

Akademia Wychowania Fizycznego im. J. Kukuczki

ul. Mikołowska 72a, 40-065 Katowice

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Michnik A, Sadowska-Krępa E, Kielboń A, Duch K, Bańkowski S, *Blood serum denaturation profile examined by differential scanning calorimetry reflects the effort put into ultramarathon by amateur long-distance runners*, in: *Journal of Thermal Biology*, vol. 99, Elsevier, DOI 10.1016/j.jtherbio.2021.103013, ISSN 0306-4565, 2021, 103013, mój udział polegał na: stworzeniu koncepcji projektu badawczego, organizacji badań, w tym rekrutacji uczestników oraz nadzorze nad prowadzonymi badaniami i czynnym udziale w pisaniu i edycji manuskryptu.


Podpis

Agnieszka Kielboń

Chorzów, 01.06.2022

Instytut Fizyki, Uniwersytet Śląski

ul. 75 Pułku Piechoty 1a, 41-500 Chorzów

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Michnik A, Sadowska-Krępa E, Kielboń A, Duch K, Bańkowski S, *Blood serum denaturation profile examined by differential scanning calorimetry reflects the effort put into ultramarathon by amateur long-distance runners*, in: Journal of Thermal Biology, vol. 99, Elsevier, DOI 10.1016/j.jtherbio.2021.103013, ISSN 0306-4565, 2021, 103013, mój udział polegał na: wykonaniu części pomiarów DSC, czynnym udziale w analizie wyników, czynnym udziale w edycji manuskryptu.


Podpis

Sebastian Bańkowski

Chorzów, 01.06.2022

Katedra Nauk Fizjologicznych i Medycznych

Akademia Wychowania Fizycznego im. J. Kukuczki

ul. Mikołowska 72a, 40-065 Katowice

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Michnik A, Sadowska-Krępa E, Kielbaso A, Duch K, Bańkowski S, *Blood serum denaturation profile examined by differential scanning calorimetry reflects the effort put into ultramarathon by amateur long-distance runners*, in: Journal of Thermal Biology, vol. 99, Elsevier, DOI 10.1016/j.jtherbio.2021.103013, ISSN 0306-4565, 2021, 103013, mój udział polegał na: udziale w organizacji eksperymentu, wykonaniu części badań biochemicznych i zabezpieczeniu materiału biologicznego do badań kalorymetrycznych.



Podpis

6. Podsumowanie

Niniejszą rozprawę doktorską stanowi seria sześciu artykułów naukowych dotyczących określenia wpływu różnych form wspomagania treningu sportowego na przebieg procesu termicznej denaturacji białek zawartych w surowicy krwi sportowców. Rozprawa łączy ze sobą zagadnienia interdyscyplinarne: fizyczne, chemiczne, biologiczne i wybrane z zakresu fizjoterapii i sportu. W pracy doktorskiej skupiono się na możliwościach zastosowania metody skaningowej kalorymetrii różnicowej w medycynie sportowej. Tematyka ta wpisuje się w trendy do poszukiwania nowych możliwości zdobywania wiedzy na temat skutków intensywnego wysiłku, przebiegu regeneracji po nim oraz metod wspomagania treningu sportowego, co pozwala na głębsze zrozumienie funkcjonowania organizmu sportowców

Zawarte w pracy [A1] rezultaty badań biochemicznych próbek surowicy krwi pobranych od osób uprawiających CrossFit wskazały, że suplementacja ekstraktem z zielonej herbaty GTE, może mieć łagodzący wpływ na potreningowe uszkodzenia mięśni. Jednakże, zebrane przy pomocy skaningowej kalorymetrii różnicowej wyniki DSC nie wykazały wyraźnego wpływu treningu ani suplementacji GTE na endotermiczne przejście związane z denaturacją białek surowicy. Brak jakichkolwiek statystycznie istotnych różnic pomiędzy uśrednionymi wartościami parametrów przejścia mógł być spowodowany zaobserwowaną dużą zmiennością osobniczą zarówno krzywych DSC surowic jak i odpowiedzi na wysiłek uczestników badania. Zaobserwowano jednak interesujące zależności parametrów termodynamicznych opisujących to przejście, od etapów przeprowadzonego eksperymentu. Stwierdzono także statystycznie istotne ujemne korelacje między potreningowym VO_{2max} a powysiłkowymi parametrami termodynamicznymi związanymi z udziałem haptoglobiny w przejściu denaturacji surowicy.

Rezultaty badań, zawarte w pracy [A2] wskazały na niewielki, ale zauważalny techniką DSC wpływ kriostymulacji ogólnoustrojowej na zmiany pojemności cieplnej towarzyszące procesowi denaturacji termicznej białek surowicy krwi w elitarnej grupie narciarzy biegowych. Po dziesięciu zabiegach WBC zaobserwowano statystycznie istotne zmniejszenie intensywności przejścia denaturacji surowicy w jego niskim zakresie temperaturowym. Dodatkowo, znaleziono zależności między względną zmianą masy tkanki tłuszczowej po dziesięciu zabiegach WBC a poziomami frakcji alfa2-globulin i beta2-globulin.

W pracy [A3] udało się udokumentować wpływ intensywnego wysiłku na kształt i parametry termodynamiczne przejścia endotermicznego reprezentującego denaturację białek surowicy krwi narciarzy biegowych. Stwierdzono statystycznie istotny efekt ćwiczeń, odzwierciedlony w niektórych parametrach tego przejścia. Uśrednione krzywe DSC roztworów surowicy zebrane w czterech etapach sesji treningowych: przed wysiłkiem, po wysiłku, po 1 h regeneracji i po 24 h odpoczynku wykazały podobny charakter zmian powysiłkowych i regeneracji niezależnie od zastosowania zabiegów WBC. Zbyt mała liczba uczestników naszego badania nie pozwoliła zweryfikować hipotezy, że WBC korzystnie modyfikuje reakcję sportowców na wysiłek i poprawia regenerację powysiłkową, ale takie trendy się pojawiły.

Rezultaty badań zawartych w pracy [A4] ponownie pozwoliły zobrazować zarejestrowane charakterystyczne, takie same jak opisane w [A3], powysiłkowe zmiany w profilu termicznym przejścia denaturacyjnego surowicy krwi narciarzy biegowych, tym razem w innym okresie treningowym. Trend zmian był podobny niezależnie od tego, czy skorzystano z serii 10 zabiegów sauny, ale ich intensywność była wyraźnie silniejsza w sesji ćwiczeń po zabiegach

w saunie. Różnice związane z korzystaniem z sauny ujawniły się szczególnie w zakresie wyższych temperatur przejścia denaturacji surowicy.

Wpływ wybranych zabiegów termicznych w tym na przykład zabiegów regeneracyjnych w saunie oraz zabiegów kriostymulacji na kondycję fizyczną osób czynnie uprawiających sport, na przykładzie grupy narciarzy biegowych scharakteryzowano w pracy [A5], która stanowi podsumowanie wyników badań DSC uzyskanych w trakcie realizacji projektu badawczego Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego /Nr0050/RS4/2016/54. Uzyskane rezultaty badań wskazują, że ćwiczenia wykonywane przez sportowców po serii zabiegów w saunie, wywołują krótkotrwałą zwiększoną modyfikację proteomu surowicy krwi, w odniesieniu do analogicznych ćwiczeń wykonywanych podczas sesji poprzedzonej zabiegami WBC. Korzystanie z zabiegów kriostymulacji ogólnoustrojowej lub sauny przed sesją ćwiczeń odpowiednio osłabia i wzmacnia reakcję sportowca na wysiłek. Nadmierny wzrost reakcji potreningowej, dodatkowo wzmocniony zabiegami w saunie, może być niebezpieczny dla zdrowia człowieka. Jednak cykl zabiegów w saunie przed sesją ćwiczeń może pomóc w zwiększeniu efektywności zmian adaptacyjnych wysiłku fizycznego u osób cieszących się dobrym zdrowiem. Tak więc połączenie kąpieli w saunie z regularną aktywnością fizyczną jest atrakcyjną opcją poprawy wyników zdrowotnych związanych z wysiłkiem fizycznym, jeśli jest stosowana rozważnie i ostrożnie.

Rezultaty badań kalorymetrycznych ujawniły zmiany w proteomie surowicy krwi uczestników 12 – godzinnego biegu ultramaratońskiego, co i przedstawiono i przedyskutowano w pracy [A6]. Pokazano, że wyczerpujący wysiłek fizyczny zmienia przebieg procesu termicznej denaturacji białek surowicy. Wyraźne zmiany w kształcie krzywych DSC zaobserwowano dla surowicy po zakończeniu biegu w stosunku do surowicy wyjściowej. Stwierdzono statystycznie istotne różnice pomiędzy etapami „przed” i „po” biegu ultramaratońskim dla parametrów przemiany endotermicznej, charakteryzujących proces denaturacji białek surowicy.

7. Spis rysunków

<i>Rysunek 1</i> Struktura molekularna ludzkiej albuminy (HSA) reprezentująca domeny, subdomeny i miejsca wiązania Sudlowa I i II. [49]	9
<i>Rysunek 2</i> Struktura immunoglobuliny IgA [50]	10
<i>Rysunek 3</i> Krzywa DSC dla typowego organicznego polimeru, gdzie: T_g – temperatura zeszklenia, Glass transition – przejście szkliste, Crystallization – Krystalizacja, Melting – topnienie, Degradation – degradacja, Oxidation - utlenianie [87]	15
<i>Rysunek 4</i> Typowa krzywa DSC białka poddanego termicznej denaturacji, gdzie T_1 do T_2 zakres temperatur procesu, T_m to temperatura przejścia związana z denaturacją białek, $\langle C_{p,N} \rangle$ to cząstkowa molowa pojemność cieplna białka natywnego, przybliżenie $\langle C_{p,N} \rangle$ funkcją liniową – linia przerywana, $\langle C_{p,D} \rangle$ to cząstkowa molowa pojemność cieplna białka zdenaturowanego, przybliżenie $\langle C_{p,D} \rangle$ funkcją kwadratową (zazwyczaj wielomian) – linia kreska-kropka, ΔC_p^{den} to zmiana pojemności cieplnej, $\langle \delta C_{pint} \rangle$ jest to wewnętrzna nadmiarowa pojemność cieplna i wyznaczana w wyniku ekstrapolacji funkcji $\langle C_{p,N}(T) \rangle$ i $\langle C_{p,D}(T) \rangle$ obszaru pomiędzy temperaturami T_1 i T_2 proporcjonalnie do postępu przejścia – linia kropkowana, $\langle \delta C_{ptrs} \rangle$ to nadmiarowa pojemność cieplna przejścia, T_x – temperatura dla której wyznaczono składowe [89]	16
<i>Rysunek 5</i> Krzywe stabilności przedstawiające zmiany parametrów termodynamicznych podczas denaturacji typowego białka globularnego [90]	18
<i>Rysunek 6</i> Struktura rzędowa białek: a - struktura pierwszorzędowa, b – struktura drugorzędowa, c – struktura trzeciorzędowa, d- struktura czwartorzędowa [91]	18
<i>Rysunek 7</i> Obraz poglądowy teorii stabilności Hawley'a [92]	19
<i>Rysunek 8(A)</i> Czarna krzywa - średnia uzyskana ze 120 próbek osocza zdrowych osób. Czerwona krzywa jest wynikiem dekonwolucji obejmującej pięć występujących w dużej ilości białek osocza. W górnej części panelu jest pokazany wykres resztkowy (krzywa obserwowana minus dopasowanie). (B) Krzywe DSC siedmiu najobficiej występujących białek w osoczu: HSA - albumina surowicy ludzkiej, IGG – immunoglobulina G, FIB – fibrynogen, IGA – immunoglobulina A, A2M – alfa-2-makroglobulina, HAPT – haptoglobina, A1AT – alfa-1-antytrypsyna [102]	21
<i>Rysunek 9</i> Porównanie profili DSC osocza osób zdrowych (różowa krzywa) z osobami chorymi na wybrane schorzenia (niebieska): A - toczeń układowy, B – borelioza, C - reumatoidalne zapalenie stawów, pionowe linie przedstawiają pierwszy moment przejścia różowy dla osób zdrowych i niebieski w przypadku choroby [105].	22
<i>Rysunek 10</i> Krzywe DSC ludzkiego osocza u zdrowych osób z grupy kontrolnej, u pacjentek z rakiem piersi z przerzutami lub bez węzłów chłonnych. Krzywe skierowane na dół reprezentują proces endotermiczny (Grupa A: bez węzłów chłonnych z przerzutami; Grupa B: 1–3 węzły chłonne z przerzutami, węzły wartownicze pozytywne; Grupa C: 4–10 węzłów chłonnych z przerzutami). [81]	22
<i>Rysunek 11</i> Uśrednione krzywe DSC dla roztworów surowicy krwi tej samej grupy osób: w buforze o pH=7,4 (czarna przerywana krzywa) oraz w wodzie (niebieska krzywa) [128]; cienie reprezentują odchylenie standardowe	23
<i>Rysunek 12</i> Krzywe DSC (a) efekt agregacji po termicznym rozfałdowaniu (surowe wyniki, pomiar własny), (b) przykład agregacji występującej równocześnie z rozfałdowaniem dla krzywych po ekspozycji surowicy na promieniowanie X, wyjściowa - czarna krzywa, kontrolna - niebieska krzywa, napromieniowana - krzywa czerwone otwarte kółka [129]	23
<i>Rysunek 13</i> Krok klasyczny [142]	25
<i>Rysunek 14</i> Krok łyżwowy [143]	25
<i>Rysunek 15</i> Dwie techniki podnoszenia ciężarów: rwanie – górna część , podrzut- dolna część [151]	26
<i>Rysunek 16</i> Kriokomora z przedsionkiem i komorą główną [179]	29

<i>Rysunek 17 Przykładowa Komora sauny fińskiej [181]</i>	30
<i>Rysunek 18 Zamrożona próbka surowicy</i>	32
<i>Rysunek 19 Schemat ideowy aparatu DSC. (1) komora próbki, (2) komora referencyjna, (3,4) elementy grzewcze, (5) zasilacz, (6) komputer, (7) miernik efektu termicznego, (8) czujnik kryształu, (9) osłona termiczna, (10) urządzenie grzewczo/chłodzące, (11) kontroler, (12) czujniki, (13) urządzenie do pomiaru temperatury bezwzględnej, (14) czujnik, (15) sumujący układ wzmacniacza, (16) zacisk, (17) zasilacz, (18, 19) pomocnicze elementy grzejne, (20) zacisk, (30) interfejs programu komputerowego, (40) pamięć komputera. [186]</i>	33
<i>Rysunek 20 Stanowisko pomiarowe</i>	34
<i>Rysunek 21 Spektrofotometr UV-VIS Jasco V-530</i>	35
<i>Rysunek 22 Porównanie średniej krzywej osób nieaktywnych fizycznie (czarna krzywa) i narciarzy biegowych (czerwona krzywa) ze wskazaniem parametrów ekstremów lokalnych przejścia endotermicznego</i>	42
<i>Rysunek 23 Zestawienie uśrednionych krzywych DSC surowic krwi sportowców uprawiających różne dyscypliny sportowe: czarna krzywa CrossFit (n=20), zielona krzywa ultramaraton (n=10), czerwona krzywa narciarze biegowi (n=9); zacienione obszary dla każdej krzywej są błędem standardowym...</i>	43
<i>Rysunek 24 Porównanie krzywych DSC surowic wybranych osób uprawiających sporty: (a) narciarstwo biegowe, (b) CrossFit, (c) ultramaraton; na wszystkich panelach kolorem czarnym oznaczona jest krzywa wyjściowa, kolorem czerwonym krzywa po wysiłku.</i>	51
<i>Rysunek 25 Porównanie krzywych DSC surowic narciarza biegowego: czarna -krzywa wyjściowa, czerwona – krzywa po wysiłku, zielona – krzywa po 1h odpoczynku, niebieska – krzywa po 24h odpoczynku; (a) wysiłek przed zabiegami kriostymulacji, (b) wysiłek przed zabiegami sauny</i>	52
<i>Rysunek 26 Porównanie krzywych DSC surowic dwóch osób uprawiających CrossFit (a) i (b): czarna – krzywa wyjściowa, czerwona – krzywa po wysiłku, zielona – krzywa po 1h odpoczynku</i>	52
<i>Rysunek 27 Porównanie profili DSC surowic po treningu CrossFit dwóch osób czarna krzywa - wyjściowa, czerwona krzywa - po treningu; (a) osoba przyjmująca placebo, (b) osoba przyjmująca GTE</i>	56
<i>Rysunek 28 Porównanie profili DSC surowic osoby uprawiającej CrossFit, linia ciągła sesja I przed suplementacją GTE, linia przerywana sesja II po suplementacji GTE; czarna krzywa – wyjściowa, czerwona krzywa – po wysiłku, zielona krzywa – po 1h odpoczynku</i>	56

8. Bibilografia

- [1] R. Murray, D. Granner i V. Rodwell, *Biochemia Harpera ilustrowana.*, Wydanie VI uaktualnione (dodruk). red., Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2010.
- [2] J. Trojanowski , *Biochemia dla biologów.*, Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 1980.
- [3] L. Stryer, *Biochemia.*, Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 1997.
- [4] S. Doonan, *Białka i peptydy.*, Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2008.
- [5] D. Whitford, *Proteins Structure and Function.*, Chichester: Wydawnictwo John Wiley&Sons, 2005.
- [6] B. Kossowska, I. Dudka, R. Gancarz i J. Antonowicz-Juchniewicz, „Analiza proteomiczna profili białkowych w niektórych stanach patologicznych ludzkiego organizmu,” *Postepy Hig Med Dosw*, tom 63, pp. 549-563, 2009.
- [7] M. Ożgo, W. Skrzypczak, A. Herosimczyk i A. Mazur, „Proteomika a fizjologia i patofizjologia nerek,” *Med. Wet.*, tom 63, pp. 1146-1150, 2007.
- [8] E. Schwarz i S. Bahn, „Biomarker discovery in psychiatric disorders,” *Electrophoresis*, tom 29, pp. 2884-2890, 2008.
- [9] R. Sowell, J. Owen i D. Butterfield, „Proteomics in animal models of Alzheimer’s and Parkinson’s diseases,” *Ageing Res. Rev.*, tom 8, pp. 1-17, 2009.
- [10] R. Sultana, M. Perluigi i D. Butterfield, „Oxidatively modified proteins in Alzheimer’s disease (AD), mild cognitive impairment and animal models of AD: role of Ab in pathogenesis,” *Acta Neuropathol.*, tom 118, pp. 131-150, 2009.
- [11] B. Tarkowski i A. Girstun, „Zastosowanie spektrometrii mas w poszukiwaniach biomarkerów chorób nowotworowych,” *Kosmos*, tom 54, pp. 331-343, 2005.
- [12] N. Verrills, „Clinical proteomics: present and future prospects,” *Clin. Biochem. Rev.*, tom 27, pp. 99-116, 2006.
- [13] C. Wan, Y. La, H. Zhu, Y. Yang, L. Jiang, Y. Chen, G. Feng, H. Li, H. Sang, X. Hao, G. Zhang i L. He, „Abnormal changes of plasma acute phase proteins in schizophrenia and the relation between schizophrenia and haptoglobin (Hp) gene,” *Amino Acids*, tom 32, pp. 101-108, 2007.
- [14] W. Caudle, S. Pan, M. Shi, T. Quinn, J. Hoekstra, R. Beyer, T. Montine i J. Zhang, „Proteomic identification of proteins in the human brain: Towards a more comprehensive understanding of neurodegenerative disease,” *Proteomics Clin. Appl.*, tom 2, pp. 1484-1497, 2008.
- [15] A. Hye, S. Lynham, M. Thambisetty, M. Causevic, J. Campbell, H. Byers, C. Hooper, F. Rijdsdijk, S. Tabrizi, S. Banner, C. Shaw, C. Foy, M. Poppe, N. Archer, G. Hamilton, J. Powell, R. Brown, P. Sham, M. Ward i S. Lovestone, „Proteome-based plasma biomarkers for Alzheimer’s disease,” *Brain*, tom 129, pp. 3042-3050, 2006.

- [16] W. Joo, D. Sul, D. Lee, E. Lee i C. Kim, „Proteomic analysis of plasma proteins of workers exposed to benzene,” *Mutat. Res.*, tom 558, pp. 35-44, 2004.
- [17] S. Lakhan i A. Kramer, „Schizophrenia genomics and proteomics: are we any closer to biomarker discovery?,” *Behav. Brain Funct.*, tom 5, 2009.
- [18] H. Liao, J. Wu, E. Kuhn, W. Chin, B. Chang, M. Jones, S. O'Neil, K. Clauser, J. Karl, F. Hasler i R. Roubenoff, „Use of mass spectrometry to identify protein biomarkers of disease severity in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis,” *Arthritis Rheum.*, tom 50, pp. 3792-3803, 2004.
- [19] K. Matsuo, Y. Xiang, H. Nakamura, K. Masuko, K. Yudoh, K. Noyori, K. Nishioka, T. Saito i T. Kato, „Identification of novel citrullinated autoantigens of synovium in rheumatoid arthritis using a proteomic approach,” *Arthritis Res. Ther.*, tom 8, pp. 175-187, 2006.
- [20] M. Thambisetty, A. Hye, C. Foy, E. Daly, A. Glover, A. Cooper, A. Simmons, D. Murphy i S. Lovestone, „Proteome-based identification of plasma proteins associated with hippocampal metabolism in early Alzheimer's disease,” *J. Neurol.*, tom 255, pp. 1712-1720, 2008.
- [21] M. Tian, Y. Cui, G. Song, M. Zong, X. Zhou, Y. Chen i J. Han, „Proteomic analysis identifies MMP-9, DJ-1 and A1BG as overexpressed proteins in pancreatic juice pancreatic ductal adenocarcinoma patients,” *BMC Cancer*, tom 8, pp. 241-252, 2008.
- [22] G. Tsangaris, P. Karamessinis, A. Kolialexi, S. Garbis, A. Antsaklis, A. Mayrou i M. Fountoulakis, „Proteomic analysis of amniotic fluid in pregnancies with Down syndrome,” *Proteomics*, tom 6, pp. 4410-4419, 2006.
- [23] C. Vascotto, A. Salzano, C. D'Ambrosio, A. Fruscalzo, D. Marchesoni, C. di Loreto, A. Scaloni, G. Tell i F. Quadrifoglio, „Oxidized transthyretin in amniotic fluid as an early marker of preeclampsia,” *J. Proteome Res.*, tom 6, pp. 160-170, 2007.
- [24] B. Waksmański i A. Olejek, „Proteomika w prognozowaniu wystąpienia raka jajnika: rzeczywistość i nadzieje,” *Przegl. Menop.*, tom 10, pp. 352-357, 2006.
- [25] H. Yamagiwa, G. Sarkar, M. Charlesworth, D. McCormick i M. Bolander, „Two-dimensional gel electrophoresis of synovial fluid: method for detecting candidate protein markers for osteoarthritis,” *J. Orthop. Sci.*, tom 8, pp. 482-490, 2003.
- [26] M. Zellner, M. Veitinger i E. Umlauf, „The role of proteomics in dementia and Alzheimer's disease,” *Acta Neuropathol.*, tom 118, pp. 181-195, 2009.
- [27] S. Prabakaran, M. Wengenroth, H. Lockstone, K. Lilley, F. Leweke i S. Bahn, „2-D DIGE analysis of liver and red blood cells provides further evidence for oxidative stress in schizophrenia,” *J. Proteome Res.*, tom 6, pp. 141-149, 2007.
- [28] N. Anderson i N. Anderson, „The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects,” *Mol. Cell. Proteomics*, tom 1, pp. 845-867, 2002.
- [29] M. Kim i C. Kim, „Human blood plasma preparation for two-dimensional gel electrophoresis,” *J. Chromatogr. B*, tom 849, pp. 203-210, 2007.
- [30] S. Encarnacion, M. Hernandez, G. Martinez-Batallar, S. Contreras, M. del Carmen Vargas i J. Mora, „Comparative proteomics using 2-D gel electrophoresis and mass spectrometry as tools

to dissect stimulons and regulons in bacteria with sequenced or partially sequenced genomes.," *Biol. Proced. Online*, tom 7, pp. 117-135, 2005.

- [31] M. Shaw i B. Riederer, „Sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis.," *Proteomics*, tom 3, pp. 1408-1417, 2003.
- [32] M. Smith, S. Bains, J. Betts, E. Choy i E. Zenders, „Use of two-dimensional electrophoresis to measure changes in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis treated with antibody to CD4.," *Clin. Diag. Lab. Immunol.*, tom 8, pp. 105-111, 2001.
- [33] E. Bonar, A. Bierczyńska-Krzysik i A. Dubin, „Elektroforeza dwuwymiarowa w żelu poliakryloamidowym.," w *Proteomika*, A. Kraj i J. Silberring, Redaktorzy, Kraków, Wydział Chemii UJ, 2004, pp. 54-60.
- [34] Y. Guo, Z. Fu i J. Van Eyk, „A proteomic primer for the clinician.," *Proc. Am. Thorac. Soc.*, tom 4, pp. 9-17, 2007.
- [35] M. Knepper, „Proteomics and the kidney.," *J. Am. Soc. Nephrol.*, tom 13, pp. 1398-1408, 2002.
- [36] B. Neumeister, I. Besenthal i B. Böhm, Diagnostyka Laboratoryjna. Poradnik kliniczny., Wrocław: Elsevier Urban & Partner, 2013.
- [37] D. Keren, Protein Electrophoresis in Clinical Diagnosis., Hodder Arnold Ltd, 2003.
- [38] D. Bobilewicz, Elektroforeza w praktyce laboratoryjnej cz.1. Rozdział elektroforetyczny białek surowicy., tom 2, Przegląd medycyny laboratoryjnej, 2005.
- [39] J. Hirsch, K. Hansen, A. Burlingame i M. Matthay, „Proteomics: current techniques and potential applications to lung disease.," *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, tom 287, pp. L1-L23, 2004.
- [40] G. Liumbruno, „Proteomics: applications in transfusion medicine," *Blood Transfus.*, tom 6, pp. 70-85, 2008.
- [41] J. Petrák, „Proteomics and its role in Medicine.," *Cas. Lek. Cesk.*, tom 144, pp. 365-370, 2005.
- [42] A. Castegna, V. Thongboonkerd, J. Klein, B. Lynn, W. Markesbery i D. Butterfield, „Proteomic identification of nitrated proteins in Alzheimer's disease brain.," *J. Neurochem.*, tom 85, p. 1394-1401, 2003.
- [43] M. Skowron, B. Grabowska-Polanowska, P. Waligórski, J. Faber i I. Śliwka, „Chromatografia cieczowa z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS), jako przykład techniki łączonej – podstawy teoretyczne i przykłady zastosowań," Luty 2016. [Online]. Available: <https://www.ifj.edu.pl/badania/publikacje/raporty/2016/2089.pdf>. [Data uzyskania dostępu: 3 grudzień 2021].
- [44] D. Hames i N. Hooper, Krótkie Wykłady Biochemia., Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2010.
- [45] W. Traczyk, Fizjologia człowieka w zarysie, Wydawnictwo Lekarskie PZWL.

- [46] Ostrowski i Kawiak, *Cytofizjologia Podręcznik dla studentów medycyny.*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL.
- [47] M. Cieplak i A. Sienkiewicz, „Białka” artykuł w *Encyklopedii Fizyki Współczesnej.*, Wydawnictwo PWN SA, Warszawa, 2004.
- [48] P. Lakshmi, M. Mondal, K. Ramadas i S. Natarajan, „Molecular interaction of 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) with human serum albumin (HSA): The spectroscopic, calorimetric and computational investigation.” *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, tom 183, pp. 90-102, 2017.
- [49] „<https://microbenotes.com/immunoglobulin-a-iga-structure-subclasses-and-functions/>,” [Online].
- [50] K. Dey, H. Wang, M. Niu, B. Bai, X. Wang, Y. Li, J.-H. Cho, H. Tan, A. Mishra, A. High, P.-C. Chen, Z. Wu, T. Beach i J. Peng, „Deep undepleted human serum proteome profiling toward biomarker discovery for Alzheimer’s disease.” *Clinical Proteomics*, tom 16, 2019.
- [51] O. Koper-Lenkiewicz, „Białka osocza w diagnostyce laboratoryjnej,” 12 marzec 2020. [Online]. Available: https://www.umb.edu.pl/photo/pliki/WF_jednostki/zaklad-lab-diagnostyki-klinicznej/dietetyka/_bialka%2Bosocza.%2Bmarkery%2Bnowotworowe%2B%2812.03.2020%29.pdf. [Data uzyskania dostępu: 5 grudzień 2021].
- [52] L. Hyla-Klekot, F. Kokot i S. Kokot, Redaktorzy, *Badania laboratoryjne. Zakres norm i interpretacja*, Warszawa: Wydawnictwo PZWL, 2018.
- [53] S. A., Red., *Choroby wewnętrzne*, Kraków: Medycyna Praktyczna, 2010.
- [54] A. Dembińska-Kieć i J. Naskalski, Redaktorzy, *Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej. Podręcznik dla studentów medycyny*, wydanie 3 red., Wrocław: Elsevier Urban & Partner Wydawnictwo, 2009.
- [55] A. Szutowicz i A. Raszei-Specht, Redaktorzy, *Diagnostyka laboratoryjna TOM II*, tom II, Gdańsk: Gdański Uniwersytet Medyczny, 2011, pp. 34-36.
- [56] J. Tomaszewski, *Diagnostyka laboratoryjna: podręcznik dla studentów medycyny*, wydanie 3 poprawione red., Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2001.
- [57] E. Pietrzykowska i M. Kieczkowski, „Wpływ błędów przedlaboratoryjnych na wiarygodność wyników badań,” *Prace kliniczne i kazuistyczne*, Warszawa, 2015.
- [58] A. Close, „Factors That Can Affect The Laboratory Tests,” LAB.ME, Knowledge, 2018.
- [59] A. Szutowicz i A. Raszei-Specht, Redaktorzy, *Diagnostyka laboratoryjna Tom I*, Uniwersytet Gdański, 2009.
- [60] „Factors that can affect laboratory investigations,” *BPAC Better Medicine*, pp. 2-11, April 2015.
- [61] Z. Jakubowski, J. Kabata, L. Kalinowski, M. Szczepańska-Konkel i S. Angielski, *Badania laboratoryjne w codziennej praktyce.*, V red., Gdańsk: MakMed, 1998.

- [62] H. Baumann, „Hepatic acute phase reaction in vivo and in vitro.,” *In Vitro Cell Dev Biol*, tom 25, pp. 115-126, 1989.
- [63] K. Bryniarski, M. Baj-Krzyworzeka, I. Filipczak-Bryniarska, T. Guzik, S. Józefowski, I. Kierzkowska, M. Korkosz, D. Kowalczyk, J. Marcinkiewicz, K. Nazimek, B. Nowak, R. Olszanecki, A. Pituch-Noworolska, M. Siedlar, D. Skiba i A. Szaflarska, „Białka ostrej fazy,” w *Immunologia dla studentów wydziałów medycznych i lekarzy*, K. Bryniarski, Red., Wrocław, edra Urban&Partner, 2017, pp. 31-33.
- [64] I. Korczowska, P. Hrycaj i J. Łacki, „Czytelnia Medyczna - Białka ostrej fazy we współczesnej diagnostyce medycznej,” 2011. [Online]. Available: <http://www.czytelniamedyczna.pl/4046,bialka-ostrej-fazy-we-wspolczesnej-diagnostyce-medycznej.html>. [Data uzyskania dostępu: 5 grudzień 2021].
- [65] A. Olewicz-Gawlik i P. Hrycaj, „Białka ostrej fazy w chorobach reumatycznych – czy tylko markery?,” *Reumatologia*, tom 45, nr 6, pp. 321-324, 2007.
- [66] W. Zielenkiewicz, *Pomiary efektów cieplnych: Metody i zastosowania.*, Warszawa: Wydawnictwo Polskiej Akademii Nauk, 2000.
- [67] W. Balcerowiak, „Kurs analizy termicznej, cz. I: DSC – ciepło właściwe, ciepło przemian.,” w *IV Szkoła Analizy Termicznej (SAT'04)*, AGH Kraków i PTKAT, Zakopane, 2004.
- [68] J. Ladbury i B. Chowdhry, *Biocalorimetry Applications of calorimetry in the biological sciences.*, Chichester: Wydawnictwo John Wiley&Sons, 1998.
- [69] K. Pielichowska, „Teoretyczne i praktyczne aspekty badań materiałów metodą różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC),” w *SAT*, Zakopane, 2019.
- [70] A. Łącz, „Metody analizy termicznej - teoria i praktyka,” w *SAT*, Zakopane, 2019.
- [71] R. McElhaney, „The use of differential scanning calorimetry and differential thermal analysis in studies of model and biological membranes.,” *Chem. Phys. Lipids.*, tom 30, pp. 229-259, 1982.
- [72] E. Freire, „Differential scanning calorimetry.,” *Methods Mol. Biol.*, tom 40, pp. 191-218, 1995.
- [73] A. Michnik, *Mikrokalorymetryczne badania przemian konformacyjnych albuminy poddanej działaniu wybranych czynników fizykochemicznych.*, Katowice: WUŚ, 2009.
- [74] A. Ferenc, K. Nedvig i D. Lőrinczy, „DSC examination of intestinal tissue following cold preservation.,” *Thermochimica Acta*, tom 497, pp. 41-45, 2006.
- [75] A. Michnik i Z. Drzazga, „Thermal denaturation of mixtures of human serum proteins. DSC study.,” *J Therm Anal Calorim.*, tom 101, pp. 513-518, 2010.
- [76] A. Michnik, „Blood plasma, serum and serum proteins microcalorimetric studies aimed at diagnosis support.,” w *Thermal analysis in medical application.*, L. D, Red., Budapest, Akadémiai Kiadó, 2011, pp. 171-190.

- [77] A. Chagovetz, R. Jensen, L. Recht i et al., „Preliminary use of differential scanning calorimetry of cerebrospinal fluid for the diagnosis of glioblastoma multiforme.,” *J Neurooncol*, tom 105, p. 499–506, 2011.
- [78] B. Antonova, E. Neydenov, R. Koynova i et al., „Exothermic transitions in the heat capacity profiles of human cerebrospinal fluid.,” *Eur Biophys J*, tom 49, p. 231–8, 2020.
- [79] I. Zapfa, T. Fekecsb, A. Ferenczc, G. Tizedesa, G. Pavlovicsa, E. Kálmánd i D. Lőrinczy, „DSC analysis of human plasma in breast cancer patients.,” *Thermochimica Acta*, tom 524, pp. 88-91, 20 Septmber 2011.
- [80] K. Kędra-Królik, I. Chmielewska, A. Michnik i et al., „Blood Serum Calorimetry Indicates the Chemotherapeutic Efficacy in Lung Cancer Treatment.,” *Sci Rep*, 2017.
- [81] P. Privalov i A. Dragan, „Microcalorimetry of biological macromolecules.,” *Biophys. Chem.*, tom 126, pp. 16-24, 2007.
- [82] J. Sturtevant, „Biochemical applications of differential scanning calorimetry.,” *Ann Rev Phys Chem.*, tom 38, pp. 463-488, 1987.
- [83] A. Cooper, „“Protein Heat Capacity: An Anomaly that Maybe Never Was”,” *J. Phys. Chem. Lett*, tom 1, pp. 3298-3304, 2010.
- [84] J. Sanchez-Ruiz, „Protein Kinetic Stability.,” *Biophys Chem*, tom 148, pp. 1-15, 2010.
- [85] M. Brown (Ed.), *Introduction to Thermal Analysis. Techniques and Applications.*, Kluwer Academic Publisher, 2001.
- [86] W. Zielenkiewicz, „Energetics of biomolecules. Thermochemical and calorimetric investigations.,” w *Thermodynamics for environment.*, Warszawa, Information Processing Centre, 2003, pp. 183-248.
- [87] I. Jelesarov i H. Bosshard, „Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energies of biomolecular recognition.,” *J Mol Recognit.*, tom 12, pp. 3-18, 1999.
- [88] P. Atkins, *Chemia Fizyczna*, Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2003.
- [89] [Online]. Available: https://www.researchgate.net/figure/Dierent-hierarchical-structures-in-proteins-a-Primary-structure-Polypeptide-chain_fig15_258020421.
- [90] V. Ragoonanan i A. Aksan, „Protein Stabilization.,” *Transfus Med Hemother*, tom 34, pp. 246-252, 2007.
- [91] P. Privalov, „Thermodynamics of protein folding.,” *Journal of Chemical Thermodynamics.*, tom 29, pp. 447-474, 1997.
- [92] P. Privalov i A. Dragan, „Microcalorimetry of biological macromolecules.,” *Biophysical Chemistry.*, tom 126, pp. 16-24, 2007.
- [93] P. Privalov, Y. Griko, S. Venyaminov i V. Kutysenko, „Cold denaturation of myoglobin.,” *Journal of Molecular Biology.*, tom 190, pp. 487-498, 1986.

- [94] J. Sanchez-Ruiz, J. Lopez-Lacomba, M. Cortijo i P. Mateo, „Differential scanning calorimetry of the irreversible thermal denaturation of thermolysin.,” *Biochemistry*, tom 27, p. 1648—1652, 1988.
- [95] J. Sanchez-Ruiz, „Theoretical analysis of Lumry — Eyring models in differential scanning calorimetry.,” *Biophys. J.*, tom 61, p. 921—935, 1992.
- [96] D. Fessas, S. Iametti, A. Schiraldi i F. Bonomi, „Thermal unfolding of monomeric and dimeric β -lactoglobulins.,” *Eur. J. Biochem.*, tom 268, pp. 5439-5448, 2001.
- [97] Y.-H. Lee i Y. Goto, „Kinetic intermediates of amyloid fibrillation studied by hydrogen exchange methods with nuclear magnetic resonance,” *Biochimica et Biophysica Acta (BAA) - Proteins and Proteomics*, tom 1824, nr 12, pp. 1307-1323, 2012.
- [98] F. Chiti i C. Dobson, „Protein misfolding, functional amyloid, and human disease.,” *Annu. Rev. Biochem.*, tom 75, pp. 333-366, 2006.
- [99] M. Fandrich, V. Forge, K. Buder, M. Kittler, C. Dobson i S. Diekmann, „Myoglobin forms amyloid fibrils by association of unfolded polypeptide segments.,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, tom 100, pp. 15463-15468, 2003.
- [100] W. Yang, E. Larios i M. Gruebele, „On the extended β -conformation propensity of polypeptides at high temperature.,” *J. Am. Chem. Soc.*, tom 125, pp. 16220-16227, 2003.
- [101] N. Gabett, C. Mekmaysy, W. Helm, A. Jenson i J. Chaires, „Differential scanning calorimetry of blood plasma for clinical diagnosis and monitoring.,” *ExpMolPathol.*, tom 86, pp. 186-191, 2009.
- [102] N. Garbett, S. Chongkham, C. Mekmaysy, L. De Leeuw i J. Chaires, „Clinical application of plasma thermograms. Utility, practical approaches and considerations.,” *Methods (San Diego, Calif.)*, tom 76, pp. 41-50, 2015.
- [103] N. Garbett, J. Miller, A. Jenson i J. Chaires, „Calorimetry outside the box: A new window into the plasma proteome.,” *Biophys J.*, tom 94, pp. 1377-1383, 2008.
- [104] S. Todinova, S. Krumova, P. Kurtev, V. Dimitrov, L. Djongov, Z. Dudunkov i S. Taneva, „Calorimetry-based profiling of blood plasma from colorectal cancer patients.,” *Biochimica et Biophysica Acta*, tom 1820, pp. 1879-1885., 2012.
- [105] Á. Dandé, B. Kocsis i D. Lőrinczy, „Thermal analysis of synovial fluids in different stages of osteoarthritis and after bacterial infections,” *J Therm Anal Calorim.*, 2020.
- [106] S. Todinova, S. Krumova, D. Bogdanova, A. Danailova, E. Zlatareva, N. Kalaydzhiev, A. Langari, I. Milanov i S. Taneva, „Red Blood Cells’ Thermodynamic Behavior in Neurodegenerative Pathologies and Aging,” *Biomolecules*, tom 11, 2021.
- [107] P. Farkas, D. Szatmári, F. Könczöl i D. Lőrinczy, „Cyclophosphamide treatment evoked side effect on skeletal muscle actin, monitored by DSC.,” *J. Therm. Anal. Calorim.*, 2021.
- [108] S. Rai, S. Srivastava, J. Pan, X. Wu, S. Rai, C. Mekmaysy, L. DeLeeuw, J. Chaires i N. Garbett, „Multi-group diagnostic classification of high-dimensional data using differential scanning calorimetry plasma thermograms,” *PLOS ONE*, 2019.

- [109] G. Schneider, A. Kaliappan, T. Nguyen, R. Buscaglia, G. Brock, M. Barousse Hall, C. DeSpirito, D. Wilkey, M. Merchant, J. Klein, T. Wiese, H. Rivas-Perez, G. Kloecker i N. Garbett, „The Utility of Differential Scanning Calorimetry Curves of Blood Plasma for Diagnosis, Subtype Differentiation and Predicted Survival in Lung Cancer,” *Cancers*, 2021.
- [110] N. Garbett i G. Brock, „Differential scanning calorimetry as a complementary diagnostic tool for the evaluation biological samples,” *Biochim Biophys Acta*, tom 1860, nr 5, pp. 981-989, 2016.
- [111] Z. Drzazga, K. Michalik, T. Halat, A. Michnik i H. Trzeciak, „Calorimetric and spectroscopic studies characterization of newborn rat’ blood serum after maternal administration of cyclophosphamide,” *J Therm Anal Calorim*, tom 102, pp. 143-148, 2010.
- [112] N. Kim, J. Jin, K. Kim, D. Lim, H. Cheong, Y. Kim, W. Ju, S. Kim i S. Jeong, „Investigation of early and advanced stages in ovarian cancer using human plasma by differential scanning calorimetry and mass spectrometry,” *Arch. Pharm. Res.*, tom 39, pp. 668-676, 2016.
- [113] A. Michnik, Z. Drzazga, K. Michalik, A. Barczyk, I. Santura, E. Sozańska i W. Pierzchała, „Differential scanning calorimetry study of blood serum in chronic obstructive pulmonary disease,” *J Therm Anal Calorim*, tom 102, pp. 57-60, 2010.
- [114] A. Michnik, E. Sadowska-Krępa, J. Cholewa, I. Schisler, A. Kielboń i Z. Drzazga, „Differential scanning calorimetry study of early and advanced stages in Parkinson’s disease using human blood serum,” *Thermochim. Acta*, tom 662, pp. 64-68, 2018.
- [115] D. Lőrinczy i A. Ferencz, „Comparison of deconvoluted plasma DSC curves on patients with solid tumors,” *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, tom 142, p. 1243–1248, 2020.
- [116] L. Kikalishvili, M. Ramishvili, G. Nemsadze, T. Lezhava, P. Khorava, M. Gorgoshidze, M. Kiladze i J. Monaselidze, „Thermal stability of blood plasma proteins of breast cancer patients, DSC study,” *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, tom 120, p. 501–505, 2015.
- [117] G. Nemsadze, T. Lezhava, M. Gorgoshidze, M. Kiladze, N. Gogelia, D. Khachidze, E. Lomidze i J. Monaselidze, „Blood plasma main proteins stability of patients with ductal carcinoma in post-surgery period,” *Int J Clin Exp Med*, tom 9, pp. 1338-1345, 2016.
- [118] J. Monaselidze, G. Nemsadze, L. Kikalishvili, M. Gorgoshidze, D. Khachidze, M. Kiladze, E. Lomidze i M. Ramishvili, „Chromatin Thermostability in Breast Carcinoma Tissue Composition,” *Bulletin of the Georgian National Academy of Sciences*, tom 5, pp. 92-95, 2011.
- [119] P. Tsvetkov, R. Eyraud, S. Ayache, A. Bougaev, S. Malesinski, H. Benazha, S. Gorokhova, C. Buffat, C. Dehais, M. Sanson, F. Bielle, D. Figarella Branger, O. Chinot, E. Tabouret i F. Devred, „An AI-Powered Blood Test to Detect Cancer Using NanoDSF,” *Cancers*, 2021.
- [120] P. Tsvetkov, E. Tabouret, A. Roman, S. Romain, C. Bequet, O. Ishimbaeva, S. Honoré, D. Figarella-Branger, O. Chinot i F. Devred, „Differential scanning calorimetry of plasma in glioblastoma: toward a new prognostic / monitoring tool,” *Oncotarget*, tom 9, p. 9391–9399, 2018.

- [121] S. Todinova, E. Stoyanova, S. Krumova, I. Iliev i S. Taneva, „Calorimetric signatures of human cancer cells and their nuclei,” *Termochimica Acta*, tom 623, pp. 95-101, 2016.
- [122] S. Todinova, B. Nikolova, I. Iliev, S. Semkova, S. Krumova i S. Taneva, „Thermodynamic behavior of breast cancer cell lines after miltefosine and cisplatin treatment,” *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2021.
- [123] G. Bálint, P. Than, I. Domán, N. Wiegand, G. Horváth i D. Lőrinczy, „Calorimetric Examination of the Human Meniscus,” *J Therm Anal Calorim*, tom 95, pp. 759-761, 2009.
- [124] J. Brandt, L. Briere, J. Marr, S. MacDonald, R. Bourne i J. Medley, „Biochemical comparisons of osteoarthritic human synovial fluid with calf sera used in knee simulator wear testing,” *J Biomed Mater Res Part A*, tom 94A, pp. 961-971, 2010.
- [125] N. Wiegand, G. Bücs, Á. Dandé i D. Lőrinczy, „Investigation of protein content of synovial fluids with DSC in different arthritides,” *J Therm Anal Calorim.*, tom 138, p. 4497–503, 2019.
- [126] A. Michnik, A. Kielboń, K. Duch, E. Sadowska-Krępa i I. Pokora, „Comparison of human blood serum DSC profiles in aqueous and PBS buffer solutions,” *J Therm Anal Calorim.*, 2021.
- [127] A. Kielboń, A. Michnik, K. Polaczek-Grelík, K. Duch i E. Sadowska-Krępa, „Differential scanning calorimetry of human blood serum exposed in vitro to X – ray radiation,” *Termochimica Acta.*, tom 680, 2019.
- [128] B. Korzeniewski, *Metabolizm*, Rzeszów: EREM-FOSZE, 1995.
- [129] R. Donatelli, *Rehabilitacja w sporcie.*, Wrocław: Elsevier Urbann&Partner, 2011.
- [130] A. Jaskólski i A. Jaskólska, *Podstawy fizjologii wysiłku fizycznego z zarysem fizjologii człowieka*, Wrocław: Wydawnictwo AWF, 2009.
- [131] J. Chmura, *Szybkość w piłce nożnej*, Katowice: AWF Katowice, 2001.
- [132] M. Fortuna, *Podstawy kształtowania i kontroli zdolności wysiłkowej tlenowej i beztlenowej*, Jelenia Góra: Kolegium Karkonoskie w Jeleniej Górze, 2008.
- [133] „Aktywność fizyczna i dieta jako czynniki kształtujące prawidłową sylwetkę”.
- [134] J. Keller, *Zarys bioenergetyki człowieka Homeostaza Organizmu Dorosłego.*, Warszawa: Wydawnictwo SGGW, 1996.
- [135] Ø. Sandbakk i H.-C. Holmberg, „A Reappraisal of Success Factors for Olympic Cross-Country Skiing,” *International Journal of Sports Physiology and Performance.*, 2013.
- [136] H.-C. Holmberg, „The elite cross-country skier provides unique insights into human exercise physiology,” *Scand J Med Sci Sports*, tom 25, p. 100–109, 2015.
- [137] T. Stöggl, C. Schwarzl, E. Müller, M. Nagasaki, J. Stöggl, P. Scheiber, M. Schönfelder i J. Niebauer, „A Comparison between Alpine Skiing, Cross-Country Skiing and Indoor Cycling on Cardiorespiratory and Metabolic Response,” *Journal of Sports Science and Medicine*, pp. 184-195, 2016.

- [138] B. Pellegrini, T. Stöggl i H.-C. Holmberg, „Developments in the Biomechanics and Equipment of Olympic Cross-Country Skiers.,” *Front Physiol.*, 2018.
- [139] K. Hébert-Losier, C. Zinner, S. Platt, T. Stöggl i H.-C. Holmberg, „Factors that Influence the Performance of Elite Sprint Cross-Country Skiers.,” *Sports Med*, tom 47, p. 319–342, 2017.
- [140] [Online]. Available: <https://crosscountryskitechnique.com/classic-skiing/>.
- [141] [Online]. Available: <https://crosscountryskitechnique.com/skate-skiing/>.
- [142] C. Zaryski i D. Smith, „Training Principles and Issues for Ultra-endurance Athletes,” *Current Sports Medicine Reports*, pp. 165-170, 2005.
- [143] [Online]. Available: www.ultra-marathon.org.
- [144] [Online]. Available: www.3100.ws.
- [145] B. Knechtle i P. Nikolaidis, „Physiology and Pathophysiology in Ultra-Marathon Running,” *Front. Physiol.*, 2018.
- [146] B. Knechtle, „Ultramarathon Runners: Nature or Nurture?,” *International Journal of Sports Physiology and Performance*, tom 7, pp. 310-2, 2012.
- [147] [Online]. Available: <https://www.britannica.com/sports/weightlifting>.
- [148] [Online]. Available: https://www.tutorialspoint.com/weightlifting/weightlifting_quick_guide.htm.
- [149] [Online]. Available: <https://cdn.britannica.com/26/5026-004-48C99547/techniques-snatch-jerk-Olympic-stages-movements.jpg>.
- [150] G. Glassman, „What is fitness.,” *CrossFit J.*, tom 3, p. 1–11, 2002.
- [151] G. Glassman, „Understanding CrossFit.,” *CrossFit J.*, tom 56, pp. 1-2, 2007.
- [152] J. Claudino, T. Gabbett, F. Bourgeois, H. de Sá Souza, R. Miranda, B. Mezêncio, R. Soncin, C. Cardoso Filho, M. Bottaro, A. Hernandez, A. Amadio i J. Serrão, „CrossFit Overview: Systematic Review and Meta-analysis.,” *Sports Med Open.*, 2018.
- [153] J. Meyer, J. Morrison i J. Zuniga, „The Benefits and Risks of CrossFitA Systematic Review.,” *Workplace Health Saf.*, tom 65, pp. 612-618, 2017.
- [154] E. Gianzina i O. Kassotaki, „The benefits and risks of the high-intensity CrossFit training.,” *Sport Sciences for Health*, tom 15, pp. 21-33, 2019.
- [155] [Online]. Available: <https://www.anty doping.pl/suplementy-diety/>.
- [156] „Australian Institute of Sport – oficjalna strona internetowa,” [Online]. Available: <http://www.ausport.gov.au/ais/> – Supplements.
- [157] [Online]. Available: https://jms.ump.edu.pl/uploads/2011/3/199_3_80_2011.pdf.
- [158] [Online]. Available: <https://www.ais.gov.au/nutrition/supplements>.

- [159] E. Sadowska-Krępa, P. Domaszewski, I. Pokora, A. Żebrowska, A. Gdańska i T. Podgórski, „Effects of medium-term green tea extract supplementation combined with CrossFit workout on blood antioxidant status and serum brain-derived neurotrophic factor in young men: a pilot study.,” *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 2019.
- [160] S. Chacko, P. Thambi, R. Kuttan i I. Nishigaki, „Beneficial effects of green tea: A literature review.,” *Chinese Medicine*, 2010.
- [161] Y. Suzuki, N. Miyoshi i M. Isemura, „Health-promoting effects of green tea.,” *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.*, tom 88, pp. 88-101, 2012.
- [162] J. Hu, D. Webster, J. Cao i A. Shao, „The safety of green tea and green tea extract consumption in adults – Results of a systematic review.,” *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, tom 95, p. 412–433, 2018.
- [163] A. Hodgson, R. Randell i A. Jeukendrup, „The Effect of Green Tea Extract on Fat Oxidation at Rest and during Exercise: Evidence of Efficacy and Proposed Mechanisms1 .,” *Adv Nutr*, tom 4, p. 129–140, 2013.
- [164] O. Stables, *Short term effect of green tea extract supplementation during moderately intense exercise on fat utilisation, in healthy human subjects.*, Lancashire: School of Sports, Tourism & Outdoors University of Central Lancashire, 2015.
- [165] E. Jówko, „Green tea catechins and sport performance.,” *Antioxidants in Sport Nutrition.*, nr 8, 2015.
- [166] T.-T. Peternelj i J. Coombes, „Antioxidant Supplementation during Exercise Training Beneficial or Detrimental?,” *Sports Med*, tom 41, pp. 1043-1069, 2011.
- [167] A. Machado, W. da Silva, M. Souza i F. Carpes, „Green Tea Extract Preserves Neuromuscular Activation and Muscle Damage Markers in Athletes Under Cumulative Fatigue.,” *Front Physiol.*, 2018.
- [168] S. Blicher, E. Bartholomae i J. Kressler, „Effects of chronic decaffeinated green tea extract supplementation on lipolysis and substrate utilization during upper body exercise.,” *Journal of Sport and Health Science*, 2019.
- [169] R. Rahimi i Z. Falahi, „Effect of Green Tea Extract on Exercise-Induced Oxidative Stress in Obese Men: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Crossover Study.,” *Asian J Sports Med.*, 2017.
- [170] H. Graham, „Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry.,” *Prev. Med.*, tom 21, p. 334–350, 1992.
- [171] T. Yamamoto, L. Juneja, D. Chu i M. Kim, „Chemistry and Applications of Green Tea,” *CRC Press: Boca Raton, FL, USA.*, pp. 6-34, 1997.
- [172] M. Prasanth, B. Sivamaruthi, C. Chaiyasut i T. Tencomnao, „A Review of the Role of Green Tea (*Camellia sinensis*) in Antiphotaging, Stress Resistance, Neuroprotection, and Autophagy.,” *Nutrients*, 2019.
- [173] Z. Śliwiński, A. Sieroń i A. Stanek, Redaktorzy, *Wielka Fizjoterapia Tom 1*, Wrocław: Wydawnictwo Elsevier Urban & Partner sp. z o.o., 2014.

- [174] A. Cholewka, W. Ciszek i Z. Drzazga, „Kriokomory stosowane w medycynie - charakterystyka temperaturowa.” w *Zastosowanie niskich temperatur w biomedycynie. I Podstawy zastosowania niskich temperatur w biomedycynie*, Wrocław, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, 2012.
- [175] T. Mika, Fizykoterapia., Wydanie II red., Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 1996.
- [176] W. Kasprzak i A. Mańkowska, Fizykoterapia, medycyna uzdrowiskowa i SPA., Wydanie I red., Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2008.
- [177] [Online]. Available: <https://www.rehabilitacja-amed.pl/oferta/komora-kriogeniczna.html>.
- [178] M. Szarek, D. Gryka, W. Pilch i Ł. Tota, „Wpływ zabiegów w saunie fińskiej na obraz białokrwinkowy we krwi młodych aktywnych fizycznie mężczyzn,” *MedOg Nauk Zdr.*, nr 20, pp. 70-75, 2014.
- [179] [Online]. Available: <http://www.leksykonmasazu.pl/slowko/sauna-finska/1237>.
- [180] J. Pawłowski, K. Pawłowska i R. Bochyński, „Sauna i jej znaczenie w treningu zdrowotnym człowieka,” *Med Og Nauk Zdr.*, tom 21, p. 282–288, 2015.
- [181] K. Ciechanowska, M. Weber-Rajek, J. Sikorska, I. Bułatowicz, A. Radziwińska, K. Strojek i W. Zukow, „Metody odnowy biologicznej w sporcie= Biological recovery methods in sport.”, *Journal of Health Sciences*, tom 4, pp. 241-252, 2014.
- [182] K. Gieremek i L. Dec, w *Zmęczenie i regeneracja sił odnowa biologiczna*, Katowice, HAS-MED, 2007, pp. 89-95.
- [183] K. Krzystyniak, w *Odnova biologiczna w sporcie i profilaktyce zdrowotnej.*, Nowy Targ, Podhalańska Państwowa Wyższa Szkoła Zawodowa w Nowym Targu, 2009, p. 191.
- [184] V. Plotnikov, J. Brandts, L.-N. Lin i J. Brandts, „A New Ultrasensitive Scanning Calorimeter.”, *Analytical Biochemistry*, tom 250, p. 237–244, 1997.
- [185] „VP-DSC MicroCalorimeter User’s Manual”.
- [186] „V-530/550/560/570SpectrophotometerInstruction Manual”.
- [187] A. Michnik, Z. Drzazga, S. Poprzęcki, M. Czuba, K. Kempa i E. Sadowska-Krępa, „DSC serum profiles of sportsmen.”, *J Therm Anal Calorim.*, tom 113, pp. 365-370, 2013.
- [188] A. Michnik, Z. Drzazga, I. Schisler, S. Poprzęcki i M. Czuba, „Diversity in athlete’s response to strength effort in normobaric hypoxia Serum DSC study.”, *J Therm Anal Calorim.*, tom 134, pp. 633-641, 2018.
- [189] A. Michnik, K. Michalik, A. Kluczevska i Z. Drzazga, „Comparative DSC study of human and bovine serum albumin.”, *J Therm Anal Calorim.*, tom 84, pp. 113-117, 2006.
- [190] N. Garbett, J. Miller, A. Jenson i J. Chaires, „Supplement 1 - Calorimetry Outside the Box: A New Window into the Plasma Proteome,” *Biophysical Journal*, tom 94, pp. 1377-1383, 2008.

- [191] M. Biermann, G. Griffante, M. Podolska, S. Boeltz, J. Stürmer, L. MuNoz, R. Bilyy i M. Herrmann, „Sweet but dangerous - the role of immunoglobulin G glycosylation in autoimmunity and inflammation.,” *Lupus*, tom 25, pp. 934-942, 2016.
- [192] C. Chen, J. Hsu, C. Lin, C. Wang, M. Tsai, C. Wu, C. Wong i C. Ma, „Crystal structure of a homogeneous IgG-Fc glycoform with the N-glycan designed to maximize the antibody dependent cellular cytotoxicity.,” *ACS Chem Biol*, tom 12, pp. 1335-1345, 2017.
- [193] Q. Gong, M. Hazen, B. Marshall, S. Crowell, Q. Ou, A. Wong, W. Phung, J. Vernes, Y. Meng, M. Tejada, D. Andersen i R. Kelley, „Gong Q, Hazen M, Marshall B Increased in vivo effector function of human IgG4 isotype antibodies through afucosylation.,” *MAbs*, tom 8, pp. 1098-1106, 2016.
- [194] K. Mizera i J. Mizera, „Znaczenie diety w sportach wytrzymałościowych, uprawianych na rekreacyjnym i wyczynowym poziomie.,” *Zarządzanie i Edukacja 2012*, tom 85, pp. 117-143, 2012.
- [195] E. Blomstrand, „Branched-Chain Amino Acids Activate Key Enzymes in Protein Synthesis after Physical Exercise.,” *The Journal of Nutrition*, tom 136, p. 2695–2735, 2006.
- [196] M. Crowe, J. Weatherson i B. Bowden, „Effects of dietary leucine supplementation on exercise performance.,” *European Journal of Applied Physiology*, tom 97, pp. 664-672, 2006.
- [197] S.-K. Lim, B. Ferraro, K. Moore i B. Halliwell, „Role of haptoglobin in free hemoglobin,” *Redox Report*, tom 6, nr 4, pp. 219-227, 2001.
- [198] P. Bärtsch, H. Mairbäurl i B. Friedmann, „Pseudoanämie durch Sport [Pseudo-anemia caused by sports].,” *Ther Umsch. German.*, tom 55, nr 4, pp. 251-255, Apr 1998.
- [199] A. Fortunato, W. Pontes, D. Soares De Souza, J. Ferreira Prazeres, L. Marcucci-Barbosa, J. Mól Santos, É. Marciano Veira, E. Bearzoti, K. De Castro Pinto, A. Talvani i A. Nunes Da Silva, „Strength Training Session Induces Important Changes on Physiological, Immunological, and Inflammatory Biomarkers,” *Journal of Immunology Research*, tom 2018, 2018.
- [200] T. Astorino i M. Schubert, „Individual responses to completion of short-term and chronic interval training: A retrospective study.,” *PLoS One*, tom 9, 2014.
- [201] B. Gurd, M. Giles, J. Bonafiglia, J. Raleigh, J. Boyd, J. Ma, J. Zelt i T. Scribbans, „Incidence of nonresponse and individual patterns of response following sprint interval training.,” *Appl Physiol Nutr Metab.*, tom 41, pp. 229-234, 2016.
- [202] J. Bonafiglia, M. Rotundo, J. Whittall, T. Scribbans, R. Graham i B. Gurd, „Inter-Individual Variability in the Adaptive Responses to Endurance and Sprint Interval Training: A Randomized Crossover Study.,” *PLoS ONE*, tom 11, 2016.
- [203] J. Gomes, R. Mendes, C. Franca, M. Da Silva-Grigoletto, D. Pereira da Silva, A. Antonioli, A. Mara de Oliveira e Silva i L. Quintans-Júnior, „Acute leucocyte, muscle damage, and stress marker responses to high-intensity functional training.,” *PLoS ONE*, tom 15, 2020.
- [204] A. Petersen i B. Pedersen, „The Anti-Inflammatory Effect of Exercise.,” *J. Appl. Physiol.*, tom 98, p. 1154–1162, 2005.

- [205] N. Jacob, J. Novaes, D. Behm, J. Vieira, M. Dias i J. Vianna, „Characterization of Hormonal, Metabolic, and Inflammatory Responses in CrossFit® Training: A Systematic Review.,” *Front. Physiol.*, 2020.
- [206] R. Poderoso, M. Cirilo-Sousa, A. Júnior, J. Novaes, J. Vianna, M. Dias, L. Leitão, V. Reis, N. Neto i J. Vilaça-Alves., „Gender Differences in Chronic Hormonal and Immunological Responses to CrossFit®,” *Int. J. Environ. Res. Public Health*, tom 16, 2019.
- [207] M. Maciążek-Jurczyk i A. Sułkowska, „Spectroscopic analysis of the impact of oxidative stress on the structure of human serum albumin (HSA) interms of its binding properties.,” *Spectrochim. Acta Part A*, tom 136, p. 265–282, 2015.
- [208] M. Maciążek-Jurczyk, B. Morak-Młodawska, M. Jeleń, W. Kopeć, A. Szkudlarek, A. Owczarzy, K. Kulig, W. Rogóż i J. Pożycka, „The Influence of Oxidative Stress on Serum Albumin Structure as a Carrier of Selected Diazaphenothiazine with Potential Anticancer Activity,” *Pharmaceuticals*, tom 14, 2021.
- [209] E. Grzebyk i A. Piwowar, „Modyfikacje glikooksydacyjne albuminy w badaniach medycznych.,” *Pol. Merkur. Lek (Pol. Med. J.)*, tom XXXIV/202, pp. 239-242, 2013.
- [210] E. Ziemann, „Jak mięśnie komunikują się z innymi narządami i co z tego wynika?,” *KOSMOS*, tom 69, p. 673–687, 2020.
- [211] B. Pedersen, T. Akerstrom, A. Nielsen i C. Fischer, „Role of myokines in exercise and metabolism.,” *J. Appl. Physiol.*, tom 103, pp. 1093-1098, 2007.
- [212] M. Bruschi, G. Candiano, L. Santucci i G. Ghiggeri, „Oxidized albumin. The long way of a protein of uncertain function.,” *Biochim Biophys Acta*, tom 1830, pp. 5473-5479, 2013.
- [213] M. Lamprecht, J. Greilberger, G. Schwabegger, P. Hofmann i K. Oettl, „Single bouts of exercise affect albumin redox state and carbonyl groups on plasma protein of trained men in a workload-dependent manner.,” *J Appl Physiol*, tom 104, pp. 1611-1617, 2008.
- [214] Y. Iwao, M. Anraku, M. Hiraike, K. Kawai, K. Nakajou, T. Kai, A. Suenaga i M. Otagiri, „The structural and pharmacokinetic properties of oxidized human serum albumin, advanced oxidation protein products (AOPP).,” *Drug Metab Pharmacokinet.*, tom 21, pp. 140-146, 2006.
- [215] R. Yung, G. Mack, R. Wolfe i E. Nadel, „Albumin Synthesis after Intense Intermittent Exercise in Human Subject.,” *Journal of Applied Physiology*, tom 84, pp. 584-592, 1998.
- [216] K. Nagashima, G. Cline, G. Mack, G. Shulman i E. Nadel, „Intense exercise stimulates albumin synthesis in the upright posture,” *Journal of Applied Physiology*, tom 88, 2000.
- [217] T. Çolak, B. Bamaç, S. Çolak, C. Duman, B. Bayazıt, S. Öztürk, B. Meriç, A. Özbek i F. Yildiz, „The Influence of a Single Bout of Wrestling Exercise on Serum Levels of Ischemia-Modified Albumin.,” *Journal of Exercise Science & Fitness*, tom 8, pp. 67-72, 2010.
- [218] P. Adogu, S. Meludu, I. Modebe i C. Ubajaka, „Albumin and Lipid Profiles Following Treadmill Exercise among Student Volunteers of Nnamdi Azikiwe University, Nnewi, Nigeria.,” *Open Journal of Preventive Medicine*, tom 5, 2015.

- [219] V. Convertino, P. Brock, L. Keil, E. Bernauer i J. Greenleaf, „Exercise Training-Induced Hypervolemia: Role of Plasma Albumin, Renin and Vasopressin.,” *Journal of Applied Physiology*, tom 48, pp. 665-669, 1980.
- [220] K. Fallon, „The Acute Phase Response and Exercise: The Ultramarathon as Prototype Exercise.,” *Clinical Journal of Sport Medicine*, tom 11, pp. 38-43, 2001.
- [221] A. Michnik, Z. Drzazga, E. Sadowska-Krępa i B. Kłapcińska, „Calorimetric monitoring of the effect of endurance training and testosterone treatment on rat serum denaturation transition.,” *J Therm Anal Calorim*, tom 115, p. 2231–2237, 2014.
- [222] J. Górski, *Fizjologiczne podstawy wysiłku fizycznego.*, Warszawa: Wydawnictwo lekarskie PZWL, 2006, pp. 466-471.
- [223] K. Herrliger, D. Chirouzes i M. Ceddia, „Supplementation with a polyphenolic blend improves post-exercise strength recovery and muscle soreness.,” *Food Nutr Res.*, tom 59, pp. 1-10, 2015.
- [224] R. Bagheri, A. Rashidlamir, D. Ashtary-Larky, A. Wong, B. Grubbs, M. Motevalli, J. Baker, I. Laher i H. Zouhal, „Effects of green tea extract supplementation and endurance training on irisin, pro-inflammatory cytokines, and adiponectin concentrations in overweight middle-aged men,” *Eur J Appl Physiol*, tom 120, pp. 915-923, 2020.
- [225] R. Bouzigon, O. Dupuy, I. Tiemessen, M. De Nardi, J.-P. Bernard, T. Mihailovic, D. Theurot, E. Miller, G. Lombardi i B. Dugué, „Cryostimulation for Post-exercise Recovery in Athletes: A Consensus and Position Paper.,” *Front. Sports Act. Living*, 2021.
- [226] A. Stanek, T. Wielkoszyński, S. Bartuś i A. Cholewka, „Whole-Body Cryostimulation Improves Inflammatory Endothelium Parameters and Decreases Oxidative Stress in Healthy Subjects.,” *Antioxidants*, tom 9, 2020.
- [227] A. Stanek, K. Sieroń-Stołtny, E. Romuk, A. Cholewka, T. Wielkoszyński, G. Cieślar, S. Kwiatek, A. Sieroń i A. Kawczyk-Krupka, „Whole-body Cryostimulation as an Effective Method of Reducing Oxidative Stress in Healthy Men,” *Adv Clin Exp Med*, tom 25, p. 1281–1291, 2016.
- [228] J. Castellani i A. Young, „Human physiological responses to cold exposure: Acute responses and acclimatization to prolonged exposure.,” *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 2016.
- [229] R. Podstawski, K. Boryśławski, C. Clark, D. Choszcz, K. Finn i P. Gronek, „Correlations between Repeated Use of Dry Sauna for 4 x 10 Minutes, Physiological Parameters, Anthropometric Features, and Body Composition in Young Sedentary and Overweight Men,” *Health Implications Hindawi BioMed Research International*, 2019.
- [230] W. Pilch, M. Szarek, A. Piotrowska, O. Czerwińska-Ledwig, E. Sadowska-Krępa, T. Pałka, Š. Andraščíková i M. Żychowska, „The Effects of a Single and a Series of Finnish Sauna Sessions on the Immune Response and Heat Shock Protein Levels in Trained and Untrained Men,” *Research Square*, 2021.
- [231] D. Gryka, W. Pilch, O. Czerwińska-Ledwig, A. Piotrowska, E. Klocek i A. Bukova, „The influence of finnish sauna treatments on the concentrations of nitric oxide, 3-nitrotyrosine and

selected markers of oxidative status in training and non-training man,” *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, p. 173–185, 2020.

- [232] M. Gorobets, L. Wasserman, A. Vasilyeva, A. Bychkova, P. Pronkin, A. Bugrova, M. Indeykina, N. Shilkina, M. Konstantinova, A. Kononikhin, E. Nikolaev i M. Rosenfeld, „Modification of human serum albumin under induced oxidation.,” *Dokl Biochem Biophys.*, tom 474, p. 231–235, 2017.
- [233] M. De Nardi, A. Bisio, L. Della Guardia, C. Facheris, E. Faelli, A. La Torre, L. Luzi, P. Ruggeri i R. Codella, „Partial-Body Cryostimulation Increases Resting Energy Expenditure in Lean and Obese Women.,” *Int. J. Environ. Res. Public Health*, tom 18, 2021.
- [234] G. Lombardi, E. Ziemann i G. Banfi, „Whole-body cryotherapy in athletes: from therapy to stimulation. An updated review of the literature.,” *Front. Physiol.*, tom 8, 2017.
- [235] C. Hausswirth, J. Louis, F. Bieuzen, H. Pournot, J. Fournier, J. Filiard i J. Brisswalter, „Effects of whole-body cryotherapy vs. far-infrared vs. passive modalities on recovery from exercise-induced muscle damage in highly-trained runners.,” *PLoS ONE*, tom 6, 2011.
- [236] A. Haq, W. Ribbans i A. Baross, „The effects of age and body fat content on post downhill run recovery following whole body cryotherapy.,” *Int. J. Environ. Res. Pub. Health*, tom 18, 2021.
- [237] J. Broatch, M. Poignard, C. Hausswirth, D. Bishop i F. Bieuzen, „Whole-body cryotherapy does not augment adaptations to high-intensity interval training.,” *Sci. Rep.*, tom 9, 2019.
- [238] J. Jaworska, E. Rodziewicz-Flis, J. Kortas, M. Kozłowska, K. Micielska, A. Babińska, R. Laskowski, G. Lombardi i E. Ziemann, „Short-term resistance training supported by whole-body cryostimulation induced a decrease in myostatin concentration and an increase in isokinetic muscle strength,” *Int J Environ Res Public Health*, tom 17, 2020.
- [239] I. Pokora, E. Sadowska-Krępa, Ł. Wolowski, P. Wyderka, A. Michnik i Z. Drzazga, „The Effect of Medium-Term Sauna-Based Heat Acclimation (MPHA) on Thermophysiological and Plasma Volume Responses to Exercise Performed under Temperate Conditions in Elite Cross-Country Skiers.,” *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2021.
- [240] O. Gibson, J. Mee, J. Tuttle, L. Taylor, P. Watt i N. Maxwell, „Isothermic and fixed intensity heat acclimation methods induce similar heat adaptation following short and long-term timescales.,” *J. Therm. Biol.*, 2015.
- [241] C. Tyler, T. Reeve, G. Hodges i S. Cheung, „The Effects of Heat Adaptation on Physiology, Perception and Exercise Performance in the Heat: A Meta-Analysis.,” *Sport Med.*, tom 46, p. 1699–1724, 2016.