

**Akademia Wychowania Fizycznego im. Eugeniusza Piaseckiego
w Poznaniu**

mgr Michał Włodarczyk

Rozprawa doktorska

**Zmiany osoczowego stężenia wskaźników
rozpadu ATP pod wpływem wysiłku
u wysoko wytrenowanych sportowców**



Akademia Wychowania Fizycznego
im. Eugeniusza Piaseckiego w Poznaniu

Promotor:

prof. AWF dr hab. Jacek Zieliński

Poznań 2019

Michał Włodarczyk MSc

Doctoral dissertation

**Changes in plasma concentration of ATP
metabolism biomarkers induced by exercise
in highly-trained athletes**



Supervisor:

Assoc. Prof. Jacek Zieliński

Spis Treści

I.	Autoreferat.....	str.1
II.	Dissertation summary.....	str.13
III.	Streszczenie / Abstract.....	str.26
IV.	Załączniki.....	str.28
	– Oświadczenia współautorów	
	– Publikacja nr 1	
	– Publikacja nr 2	

I. AUTOREFERAT W JĘZYKU POLSKIM

Podstawą rozprawy doktorskiej jest cykl publikacji pod wspólnym tytułem: „Zmiany osoczowego stężenia wskaźników rozpadu ATP pod wpływem wysiłku u wysokowytrenowanych sportowców”, w którego skład wchodzi dwie publikacje przygotowane na podstawie badań wykonanych w ramach projektu naukowego nr 2013/09/B/NZ7/02556, finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

1. *Changes in blood concentration of adenosine triphosphate metabolism biomarkers during incremental exercise in highly trained athletes of different sport specializations*, Journal of Strength and Conditioning Research 33(5)/1192–1200, 2019 – impact factor - 3.017, punktacja ministerstwa – 100 pkt.
2. *Change in lactate, ammonia and hypoxanthine concentrations in a 1-year training cycle in highly trained athletes: applying biomarkers as tools to assess training status*, Journal of Strength and Conditioning Research. August 29, 2019 - Volume Publish Ahead of Print doi: 10.1519/JSC.0000000000003375 – impact factor - 3.017, punktacja ministerstwa – 100 pkt.

Wstęp

Pomimo obszernej wiedzy dotyczącej obciążeń treningowych, nadal trudno jest określić dokładnie, jak organizm sportowca będzie na nie reagował. Niewiele jest też sprawdzonych parametrów, które trafnie pozwalają określić obciążenia wewnętrzne ustroju (Bompa 1999, Bompa i Haff 2009). Można wyróżnić jednak biochemiczne substancje nazywane biomarkerami, które są mierzalnymi produktami reakcji zachodzących w organizmie człowieka. Oznaczanie biomarkerów prowadzi do obiektywnego pomiaru fizjologicznych lub patologicznych procesów występujących w stanie zdrowia, choroby lub w wyniku farmakologicznego leczenia (Finsterer i wsp. 2012). Wyróżnić można biomarkery uszkodzenia i zmęczenia mięśniowego (Brancaccio i wsp. 2010, Finsterer i wsp. 2012) oraz biomarkery metaboliczne np: kości, nerek, wątroby, mięśnia sercowego (w zależności od miejsca produkcji) (Banfi i wsp. 2012).

Wysiłek fizyczny powoduje wzrost stężenia biomarkerów, których zmiany można obserwować między innymi we krwi. Najbardziej przydatne w sporcie wydają się być

biomarkery, które pomagają określić zmęczenie mięśniowe, ponieważ pozwalają w sposób pośredni określić stan energetyczny organizmu. Zmęczenie mięśniowe wywołane wysiłkiem fizycznym określane jest, jako odwracalny spadek siły mięśniowej (kurczliwości mięśni) podczas pracy wykonywanej przez pewien okres czasu (zmęczenie obwodowe podczas wysiłku) (Gosker i wsp. 2008, Rainoldi i wsp. 2008). Jako główne powody zmęczenia mięśniowego podaje się m.in. kwasicę i wyczerpanie zasobów adenozy-5'-trifosforanu (ATP), wywołane przez zwiększone zapotrzebowanie albo zmniejszone dostarczenie ATP, odzwierciedlane przez kumulację biomarkerów rozpadu ATP: mleczanu (LA), amoniaku (NH_3) i oksypuryn (hipoksantyny (Hx) i ksantyny (X)). Za kolejny powód zmęczenia uznaje się nadprodukcję reaktywnych form tlenu (ROS), odzwierciedlane przez biomarkery takie jak substancje reagujące z kwasem tiobarbiturowym (TBARS), izoprostany (FS-IsoP), białkowe grupy karbonylowe (PC), zredukowany glutation (GSH), peroksydaza glutationowa (GPx), katalaza (CAT), całkowita pojemność antyoksydacyjna (TAC) (Boyas i Guével 2011, Finsterer i wsp. 2012). Inne mniej zdefiniowane przyczyny zmęczenia mięśniowego to miejscowe reakcje zapalne, odzwierciedlone przez biomarkery takie jak leukocyty (L), czynnik martwicy nowotworów ($\text{TNF-}\alpha$) i interleukiny (IL) oraz zmienione wydzielanie i wychwytywanie wapnia (Ca^{2+}), zaburzenie szlaków energetycznych (wyczerpanie glikogenu), i zaburzona endokrynną funkcją mięśni (Boyas i Guével 2011, Finsterer i wsp. 2012).

Stężenie biomarkerów w mięśniu, a następnie we krwi uzależnione jest od intensywności oraz typu wysiłku, a także czasu jego trwania. Ze względu na brak głównej i jednoznacznej przyczyny zmęczenia, nie ma jednego „uniwersalnego” biomarkera zmęczenia mięśniowego (Finsterer i wsp. 2012).

W momencie rozpoczęcia wysiłku całkowita pula nukleotydów adeninowych jest stała (Hellsten i wsp. 1999, Stathis i wsp. 1999, 2006, Ipata i Pesi 2018). Wraz ze wzrostem intensywności i czasu trwania wysiłku fizycznego stosunek ATP/ADP (adenozy-5'-difosforan) ulega obniżeniu z powodu dużego zużycia ATP, a całkowita pula nukleotydów adeninowych ulega zmniejszeniu. Organizm stara się zachować stałe stężenie ATP aktywując 4 procesy resyntezy: system energetyczny tlenowy, system energetyczny beztlenowy glikolityczny, system energetyczny beztlenowy fosfagenowy oraz reakcje miokinazową (Stathis i wsp. 1999, 2006, Ipata i Pesi 2018). Efektem działania tych systemów energetycznych są produkty uboczne kumulujące się w pracujących mięśniach, które

następnie przenikają do krwioobiegu. Dlatego zostały one nazwane biomarkerami metabolizmu ATP, odzwierciedlając pośrednio status energetyczny mięśnia. Należą do nich mleczan, amoniak i oksypuryny (hipoksantyna i ksantyna) (Finsterer i wsp. 2012).

Dotychczas większość badań dotyczyła oceny poziomu pojedynczych biomarkerów. Brak jest prac, które pokazywałyby ich wzajemne relacje oraz dynamikę zmian w trakcie lub po wysiłku u zawodników różnych dyscyplin sportowych w rocznym cyklu treningowym. Najbardziej zbliżone wydawać się mogą prace Banistera i wsp. (1983), Stathisa i wsp. (1994, 2006), Yuan i wsp. (2002, 2004), Gorostiagi i wsp. (2014), Ogino i wsp. (2000), Zielińskiego i wsp. (2009, 2011, 2012, 2013a i 2013b). Jednak żaden z wymienionych badaczy nie analizował jednocześnie zmian pomiędzy LA, NH₃ oraz metabolitami puryn (Hx, X, UA (kwas moczowy)). Autorzy nie oceniali również zmian badanych parametrów w czasie wysiłku oraz restytucji, a także w rocznym cyklu treningowy (wykonując ten sam test wielokrotnie u tych samych osób). Wyżej wymienieni autorzy nie analizowali różnych grup sportowych o odmiennym charakterze treningu (szybkościowo-siłowy, wytrzymałościowy, mieszany), a także nie oceniali zmian biomarkerów w odniesieniu do składu ciała (masy mięśniowej).

Cel badań przedstawionych w dwóch artykułach

Celem badań było określenie zmian w stężeniu biomarkerów metabolizmu ATP (LA, NH₃ i metabolitów puryn) we krwi, podczas stopniowanego wysiłku oraz w fazie restytucji, u sportowców o odmiennym profilu treningowym, różnej masie mięśniowej (publikacja 1) w rocznym cyklu treningowym (publikacja 2).

Hipotezy badawcze:

- (a) wyspecjalizowany trening sportowy (szybkościowo-siłowy, wytrzymałościowy, mieszany) powoduje odmienne adaptacje prowadzące do specyficznej dynamiki uwalniania biomarkerów do krwi podczas standardowego wysiłku oraz w okresie powysiłkowej restytucji,
- (b) wyższa masa mięśniowa będzie powodować zwiększone uwalnianie analizowanych biomarkerów,
- (c) w rocznym cyklu treningowym zmienia się dynamika uwalniania biomarkerów do krwi podczas standardowego wysiłku oraz w okresie powysiłkowej restytucji.

Metody

Procedury badań

Badania zostały wykonane w godzinach porannych, 3 godziny po lekkim śniadaniu. Uczestnicy badań zostali poinstruowani aby nie uczestniczyć w żadnych sesjach treningowych co najmniej 24 godziny przed badaniem. Wykonano analizę składu ciała oraz test wysiłkowy o wzrastającej intensywności do odmowy. Podczas wszystkich badań, temperatura w laboratorium utrzymywana była na poziomie 20-21°C.

Antropometria i składu ciała

Pomiar masy (kg) oraz wysokości (cm) ciała wykonano przy użyciu stadiometru (SECA 285; SECA, Hamburg, Niemcy). Analizę składu ciała wykonano metodą dwuenergetycznej absorpcjometrii rentgenowskiej (DXA) przy użyciu aparatu Lunar Prodigy Pro (GE Healthcare, Madison, WI, USA). Masę mięśni szkieletowych (SMM) oszacowano na podstawie wzoru Kim i wsp. (2002).

Test wysiłkowy

Badani wykonywali test wysiłkowy o wzrastającej intensywności do odmowy na bieżni mechanicznej (H/P Cosmos Pulsar Sports & Medical, Nussdorf-Traunstein, Germany). W celu określenia maksymalnego poboru tlenu (VO_{2max}) użyto ergospirometru (Cortex Metamax 3B, Leipzig, Niemcy). Częstość skurczów serca (ud/min) monitorowano przy użyciu pulsometra Polar Smart H6 (Polar Electro Oy, Kempele, Finlandia).

Pobieranie próbek krwi

Przed wykonaniem testu wysiłkowego badanym założono wenflon (BD Venflon Pro 1.3 x 32 mm; Becton Dickinson, Helsingborg, Sweden) do żyły łokciowej. Próbkę krwi zostały pobrane w spoczynku, po każdym 3-minutowym etapie biegu, bezpośrednio po wysiłku oraz 5, 10, 15, 20 i 30 minut w fazie restytucji. Próbkę krwi zostały pobrane do dwóch probówek (S-Monovette 2.7 ml KE; Sarstedt, Nümbrecht, Germany), jedna zawierała heparynę, a druga wersenian sodowo-potasowy.

Analiza biomarkerów

Stężenie mleczanu we krwi pełnej oznaczano za pomocą urządzenia Biosen C-line (EKF diagnostic GmbH, Barleben, Niemcy) natomiast amoniaku, aparatem PocketChem BA PA-4140 (Arkay, Kyoto, Japonia).

Metabolity puryn (hipoksantyna, ksantyna, kwas moczowy) analizowano przy pomocy wysokosprawnej chromatografii cieczerwowej (HPLC) z detekcją w ultrafiolecie, metodą Smoleńskiego i Yacoub. (1993).

Opisana metoda została wykonana jednorazowo podczas badań opisanych w pierwszej publikacji (wszyscy zawodnicy byli po okresie przejściowym na początku okresu przygotowawczego) oraz czterokrotnie w badaniach w drugiej publikacji (koniec okresu przejściowego, początek okresu przygotowania ogólnego, początek okresu przygotowania specjalnego, początek okresu startowego).

Wyniki i ich omówienie

Publikacja 1

Changes in blood concentration of adenosine triphosphate metabolism biomarkers during incremental exercise in highly trained athletes of different sport specializations, Journal of Strength and Conditioning Research 33(5)/1192–1200, 2019 (pierwszy artykuł).

W badaniu uczestniczyły cztery grupy sportowców: sprinterzy (SP, N=11) specjalizujący się w biegu na 100m i 200m, w wieku 24.2 ± 3.2 lat, stażu treningowym 8.5 ± 2.5 lat, sportowcy wytrzymałościowi (EN, n=16) w skład których zaliczono triatlonistów i biegaczy długodystansowych, w wieku 23.4 ± 3.6 lat, stażu treningowym 8.7 ± 1.9 lat, futsaliści (FU, n=12) w wieku 24.5 ± 3.8 lat, stażu treningowym 10.0 ± 3.4 lat oraz biegacze amatorzy (AM, n=12) stanowiący grupę kontrolną, w wieku 27.7 ± 4.1 lat w przeszłości i obecnie nie uprawiający sportu (aktywni fizycznie, 3-5 razy w tygodniu).

Jest to pierwsza praca, w której analizowano stężenie biomarkerów rozpadu ATP (LA, NH₃, i puryny) we krwi podczas spoczynku, w wysiłku o wzrastającej intensywności i w okresie powysiłkowej restytucji u sportowców o odmiennym charakterze treningu. Każda grupa zawodników reprezentowała odrębny profil fizjologiczno-metaboliczny. Sprinterzy reprezentowali profil sportowców szybkościowo-siłowych, u których dominują wysiłki o bardzo wysokiej intensywności oparte głównie o procesy beztlenowe (Billat i wsp. 2001). Triatloniści i biegacze długodystansowi reprezentowali grupę sportowców wytrzymałościowych, którzy wykonują w większym stopniu wysiłki o charakterze tlenowym w swoim treningu (Beato i wsp. 2017). Futsaliści reprezentowali grupę sportowców gier

zespołowych charakteryzujących się mieszanym udziałem systemów energetycznych (od szlaków tlenowych do beztlenowych) (Naser i Ali 2017).

Wykazaliśmy, że wzorzec zmian oraz poziom stężenia biomarkerów zależy od specyficznego profilu treningowego badanych sportowców. W spoczynku, podczas wysiłku o wzrastającej intensywności oraz w okresie restytucji powysiłkowej sprinterzy mieli najniższe stężenie puryn, a sportowcy wytrzymałościowi mieli najniższe stężenie amoniaku. Najniższe stężenie LA odnotowano u sportowców wytrzymałościowych podczas wysiłku (jednak przy maksymalnej intensywności wysiłku, różnice pomiędzy grupami nie były statystycznie istotne). Sprinterzy mieli najwyższe wartości SMM w porównaniu do zawodników z innych grup. Nie zaobserwowano korelacji pomiędzy SMM, a stężeniem biomarkerów podczas maksymalnej intensywności wysiłku oraz w czasie restytucji w żadnej z badanych grup.

Mleczan i amoniak

LA i NH_3 są cennymi parametrami w monitorowaniu statusu treningowego u wysokowytrenowanych sportowców. W oparciu o ich pomiar można pośrednio określić status energetyczny mięśni szkieletowych. Największą wartość diagnostyczną ma ich ocena w czasie wysiłku. W okresie tym oba metabolity wzrastają proporcjonalnie do intensywności wysiłku i osiągają maksymalne stężenie przy maksymalnej intensywności wysiłku.

Określanie progu LA jest często używane przez sportowców wytrzymałościowych do programowania odpowiednich obciążeń treningowych (Gladen 2004, Goodwin i wsp. 2007). Jednak, do określania obciążeń treningowych przy niskich intensywnościach (poniżej progu LA), NH_3 okazuje się być bardziej przydatnym narzędziem (lepiej różnicującym badane grupy sportowców). NH_3 można wykorzystać jako pośredni wskaźnik utraty ATP w mięśniu podczas wysiłku (Gorostiaga i wsp. 2014) gdyż wzrasta proporcjonalnie do intensywności wysiłku i jest bardziej czuły na zmiany intensywności wysiłku przy intensywnościach poniżej progu LA. Określanie stężenia NH_3 może być więc wykorzystywane do ewaluowania, monitorowania i planowania intensywności wysiłku podczas testów wysiłkowych oraz planowaniu rocznego cyklu treningowego.

LA jest bardziej adekwatnym markerem do oceny intensywności wysiłku u sprinterów i sportowców gier zespołowych, głównie podczas treningów o wysokiej intensywności, wskazującym na tempo wykorzystania glikolizy beztlenowej podczas wysiłku (Bompa 1999, Brooks 2007, Beneke i wsp. 2011).

Metabolity puryn

Pomiar stężenia puryn, odzwierciedla utratę pochodnych nukleotydów adeninowych z mięśni. Obrazując tym samym odpływ prekursorów wysoko energetycznych związków z organizmu. Stężenie metabolitów puryn, warto mierzyć po wysiłku, żeby określić ich całkowitą utratę. Może to być pomocne w ocenie czasu potrzebnego na regenerację sportowców szczególnie po treningach o wysokiej intensywności. Poziom Hx również wskazuje na adaptację do wysiłków o wysokiej intensywności przez zmniejszony odpływ puryn z mięśni szkieletowych i może być również uważane za marker metabolizmu beztlenowego (pomiaru można dokonać bezpośrednio po wysiłku) (Gorostiaga i wsp. 2012, Zieliński i wsp. 2013a). Oznaczanie Hx jest w szczególności wartościowe, gdyż często używane parametry takie jak „VO_{2max},” „próg anaerobowy,” lub stężenie LA nie są wrażliwe na zmiany statusu treningowego u wysokowytrenowanych sportowców. Obserwacja zmian poziomu Hx może być przydatna podczas okresów bezpośredniego przygotowania startowego w celu oceny przygotowania i gotowości zawodników do zawodów (Zieliński i wsp. 2009). Pomiar stężenia hipoksantyny i ksantyny, jest wskazany bezpośrednio po wysiłku lub w okresie restytucji (najlepiej w 10 minucie, kiedy jego kumulacja jest najwyższa).

X miała podobny profil zmian do Hx, jednak należy pamiętać, że jej kumulacja następuje w nieodwracalnej reakcji z hipoksantyny, stąd jej oznaczenie może mieć ograniczoną wartość diagnostyczną. Natomiast znaczenie ksantyny może być istotne ze względu na towarzyszące jej kumulacji, powstawanie reaktywnych form tlenu. Nie było to jednak badane w opublikowanej pracy.

Osoczowe stężenie UA nie osiągnęło wartości szczytowych podczas wysiłku, a nawet 30 minut po jego zakończeniu, co podważa jego przydatność jako biomarkera statusu mięśniowego.

Wpływ masy mięśniowej

Podczas testu o wzrastającej intensywności nie zaobserwowano korelacji pomiędzy SMM, a stężeniem biomarkerów przy maksymalnej intensywności oraz po wysiłku we wszystkich badanych grupach. Wskazuje to, że poziom masy mięśniowej nie jest znacząco związany z wielkością uwalniania biomarkerów we krwi. Nie wykonaliśmy biopsji mięśniowej, dlatego nie byliśmy w stanie określić poziomu stężenia biomarkerów w mięśniu, a co za tym idzie dokonać analizy korelacji z poziomem biomarkerów we krwi. Jednak możemy stwierdzić że to profil treningowy, jako wynik adaptacji metabolicznej w mięśniu

wpływa na przebieg uwalniania biomarkerów we krwi, a nie sama masa mięśniowa. Pomimo tego, że większa masa mięśniowa może rzeczywiście przyczyniać się do większego absolutnego stężenia biomarkerów w mięśniu, to stężenie we krwi jest rezultatem wielu czynników (m.in. produkcji i utylizacji w wielu procesach metabolicznych). Analiza stężenia biomarkerów w przeliczeniu na masę mięśniową (na 1kg SMM) nie ma żadnej wartości diagnostycznej. Sportowcy o dużej masie mięśniowej mają niższy poziom biomarkerów przy tej samej intensywności wysiłku, co może wskazywać na ich wyższy niż rzeczywisty poziom wytrenowania.

Zastosowania praktyczne

Zmiany stężenia biomarkerów wywołane wysiłkiem (podczas standardowego testu progresywnego do wyczerpania) wiążą się z adaptacją do specyficznego treningu. Pomiar stężenia LA, NH₃, i Hx we krwi pozwala pośrednio uzyskać informację o reakcji wysiłkowej i statusie energetycznym bez potrzeby stosowania inwazyjnych metod takich jak biopsja mięśniowa.

Należy pamiętać, że te każdy metabolit odgrywa różne rolę:

- stężenie LA we krwi jest przydatne u sportowców wykonujących jednostki treningowe, w których występuje duży udział glikolizy beztlenowej oraz w dyscyplinach sportu, w których określenie progu LA jest potrzebne, aby wyznaczyć zakresy intensywności;
- stężenie NH₃ jest przydatne w monitorowaniu wysiłków o niskich intensywnościach u sportowców wytrzymałościowych, w ocenie utraty ATP podczas wysiłku (zarówno o niskiej jak i maksymalnej intensywności) oraz w planowaniu i kontroli treningu;
- stężenie puryn we krwi, w szczególności Hx, jest cennym narzędziem do określania powysiłkowej utraty pochodnych puryn. Hx może wskazywać na adaptację do wysiłku anaerobowego oraz pozwala na ocenę statusu treningowego w różnych fazach rocznego cyklu treningowego (w szczególności podczas bezpośredniego przygotowania startowego), niezależnie od dyscypliny sportowej.

Masa mięśni szkieletowych nie wpływa na wielkość uwalniania biomarkerów. Dalsze badania powinny dotyczyć zmian poziomów analizowanych biomarkerów na specyficzne jednostki treningowe wykonywane przez wysokowytrenowanych sportowców.

Publikacja 2

Change in lactate, ammonia and hypoxanthine concentrations in a 1-year training cycle in highly trained athletes: applying biomarkers as tools to assess training status, Journal of Strength and Conditioning Research. August 29, 2019 - Volume Publish Ahead of Print doi: 10.1519/JSC.0000000000003375 (drugi artykuł).

W badaniu uczestniczyły cztery grupy sportowców: sprinterzy (SP, n=12) specjalizujący się w biegu na 100m i 200m, w wieku 24.1 ± 3.2 lat, stażu treningowym 8.4 ± 2.4 lat, triathloniści (TR, n=11) w wieku 23.6 ± 3.6 lat, stażu treningowym 7.8 ± 1.7 lat, futsaliści (FU, n=12) w wieku 24.6 ± 4.5 lat, stażu treningowym 9.6 ± 4.1 lat oraz biegacze amatorzy (AM, n=12) stanowiący grupę kontrolną, w wieku 25.4 ± 4.2 lat w przeszłości i obecnie nie uprawiający sportu (aktywni fizycznie, 3-5 razy w tygodniu).

Z naszych badań wynika, że stężenia biomarkerów zmieniają się w rocznym cyklu treningowym w spoczynku, w czasie wysiłku oraz w restytucji. Zmiany w stężeniu analizowanych biomarkerów są uzależnione od specyfiki treningu (szybkościowy, wytrzymałościowy, mieszany). Największe różnice w stężeniu analizowanych biomarkerów u wszystkich badanych grup sportowców odnotowano w odniesieniu do Hx w momencie maksymalnej kumulacji we krwi (10 min po wysiłku) oraz w okresie restytucji. W przypadku NH_3 w momencie zakończenia testu wysiłkowego, a LA podczas początkowych etapów testu wysiłkowego. Nie zaobserwowano żadnych zmian biomarkerów w cyklu treningowym w grupie AM.

Zmiany osocznego stężenia mleczanu

U zawodników odnotowano zmiany stężenia LA pomiędzy kolejnymi podokresami rocznego cyklu treningowego, we wszystkich grupach sportowych. Jednak wystąpiły one tylko pomiędzy okresem przejściowym, a pozostałymi trzema okresami treningowymi w punktach pomiarowych występujących w fazie wysiłkowej testu.

Ze względu na to, że grupa AM nie podlegała periodyzacji treningu, a ich poziom aktywności był stały (obciążenia treningowe nie ulegały zmianom) przez cały rok nie odnotowano zmian stężeń LA w czterech terminach badań.

Zmiany osoczowego stężenia amoniaku

Zmiany stężenia NH_3 odnotowano kolejno we wszystkich badanych okresach cyklu treningowego (najniższe w okresie startowym, najwyższe w okresie przejściowym) u wszystkich grup sportowych. Nie stwierdzono żadnych zmian w grupie AM.

Zmiany osoczowego stężenia metabolitów puryn

Zmiany stężeń Hx miały zbliżony przebieg do tych uzyskanych w przypadku NH_3 . Nie stwierdzono żadnych zmian w grupie AM.

Podobny przebieg zmian jak w przypadku Hx i NH_3 uzyskano odnośnie zmian X i UA. Dlatego ich przebiegi nie zostały zaprezentowane w wynikach badań. Ponadto w przypadku UA pomimo zbliżonych przebiegów nie odnotowano żadnych różnic istotnych statystycznie. Co było prawdopodobnie związane z opóźnionym w czasie (30 min po wysiłku) uzyskaniem wartości maksymalnych. Stąd uznano, że oznaczanie tego metabolitu ma obniżoną wartość diagnostyczną.

Biomarkery jako narzędzie w ocenie statusu treningowego

LA, NH_3 , i Hx są użytecznymi biomarkerami w procesie treningowym u wysokowytrenowanych sportowców, lecz każdy z nich ma inne zastosowanie. Oznaczanie stężenia LA w rocznym cyklu treningowym jest korzystne podczas początkowych etapów testu wysiłkowego o wzrastającej intensywności, w celu określenia wstępnej adaptacji do treningu, szczególnie po okresach roztrenowania. Ponadto, LA można zastosować do określenia intensywności wysiłku, progu anaerobowego, udziału glikolizy anaerobowej podczas treningu oraz w celu wyznaczania zakresów intensywności (Brooks i wsp. 2007, Goodwin i wsp. 2007, Beneke i wsp. 2011). Oznaczanie stężenia NH_3 w rocznym cyklu treningowym może być pomocne w pośrednim określeniu utraty ATP (Gorostiaga i wsp. 2012, Green i wsp. 2014) oraz adaptacji do wysiłków beztlenowych (Itoh i Ohkuwa 1991).

Zmiany w stężeniu NH_3 w rocznym cyklu treningowym są najbardziej widoczne przy wysiłkach maksymalnych, kiedy deaminacja AMP (adenozyno-5'-monofosforan) jest najwyższa (Hellsten i wsp. 1999). Oznaczanie stężenia Hx w rocznym cyklu treningowym może określić adaptacje do wysiłków anaerobowych, także status treningowy zawodnika, a nawet stan gotowości do zawodów niezależnie od specjalizacji sportowej. Jest w szczególności cenne u wysokowytrenowanych sportowców, którzy w swoich planach treningowych mają jednostki treningowe zawierające wysiłki o wysokiej intensywności. W celu uzyskania informacji dotyczącej stężenia maksymalnego (informującej o utracie

po pochodnych puryn), należy pobrać krew 10 minut po wysiłku, natomiast w celu oceny adaptacji organizmu do wysiłków beztlenowych można go wykonać bezpośrednio po wysiłku. Ponadto analiza zmian stężeń Hx wykazała najwięcej różnic pomiędzy terminami badań w grupach sportowych. To sugeruje, że stosowanie pomiaru stężenia Hx jest najbardziej wrażliwym/czułym biomarkerem określającym adaptację treningową w rocznym cyklu treningowym u wysokowytrenowanych sportowców.

W pracy dokonano również analizy zmiany stężeń biomarkerów w przeliczeniu na masę mięśniową. Jednak uzyskane wyniki analiz statystycznych były zbliżone do tych wykonanych na wartościach wartości bezwzględnych.

Zastosowania praktyczne

Ocena zmiany stężeń LA, NH₃ i Hx podczas standardowego testu wysiłkowego o wzrastającej intensywności może być pomocna w określaniu statusu treningowego w różnych okresach rocznego cyklu. Każdy metabolit może służyć do uzyskania innych informacji:

- LA może być pomocny w określeniu wstępnej adaptacji do treningu, szczególnie pomiędzy okresem przejściowym a podokresem przygotowania ogólnego,
- NH₃ może być używany do monitorowania adaptacji organizmu do wysiłków beztlenowych, jest bardziej wrażliwy na zmiany przy niższych intensywnościach, może być wykorzystywany w dyscyplinach wytrzymałościowych w celu lepszego monitorowania zmian pomiędzy okresami treningowymi,
- Hx odzwierciedla adaptację organizmu, do treningu z dużym udziałem ćwiczeń beztlenowych, określa utratę pochodnych puryn z organizmu oraz jest najbardziej sensytywnym wskaźnikiem w ocenie zmian statusu treningowego.

Pomiar stężenia Hx bezpośrednio po wysiłku będzie miał tę samą wartość diagnostyczną jak w późniejszym okresie czasu (do 30 minuty), wskazując na efektywność organizmu mierzoną zmniejszonym odpływem puryn. Natomiast pomiar odzwierciedlający całkowitą utratę puryn powinien nastąpić około 10 min po wysiłku.

Wnioski

- Stężenia LA, NH₃ i Hx ulegają zmianie w rocznym cyklu treningowym, w zależności od typu treningu oraz wielkości obciążeń treningowych zastosowanych w różnych okresach cyklu.
- Nie stwierdzono związku pomiędzy masą mięśni szkieletowych a stężeniem biomarkerów.
- Łączny pomiar stężenia LA, NH₃ i Hx we krwi może w pośredni sposób odzwierciedlać zmiany w statusie energetycznym mięśni wywołanych wysiłkiem i treningiem.
- Zmiany stężeń NH₃ i Hx są bardziej wrażliwe w porównaniu do LA na zmiany statusu treningowego ocenianego testem wysiłkowym w długich cyklach treningowych.

II. DISSERTATION SUMMARY

The basis of this doctoral dissertation is a series of studies all concerning the topic: “Changes in plasma concentration of ATP metabolism biomarkers induced by exercise in highly-trained athletes,” which include research carried out as part of grant nr 2013/09/B/NZ7/02556 funded by the National Science Centre.

1. *Changes in blood concentration of adenosine triphosphate metabolism biomarkers during incremental exercise in highly trained athletes of different sport specializations*, Journal of Strength and Conditioning Research 33(5)/1192–1200, 2019 – impact factor - 3.017, ministry points – 100.
2. *Change in lactate, ammonia and hypoxanthine concentrations in a 1-year training cycle in highly trained athletes: applying biomarkers as tools to assess training status*, Journal of Strength and Conditioning Research. August 29, 2019 - Volume Publish Ahead of Print doi: 10.1519/JSC.0000000000003375 – impact factor - 3.017, ministry points – 100.

Introduction

Although there is a plethora of knowledge regarding training load application, it is still difficult to precisely determine how an athlete’s body will specifically react. There is a small amount of verified parameters, which accurately allow to determine internal load of the body (Bompa 1999, Bompa and Haff 2009). However, we can determine biochemical substances called biomarkers, which are objective measures of the reactions taking place in the human body. Determining biomarker concentration leads to objective measurements of the physiological and pathological processes occurring during health, disease or a result of pharmacological treatment (Finsterer et al. 2012). Biomarkers can be divided into biomarkers of muscle damage and fatigue (Brancaccio et al. 2010, Finsterer et al. 2012) as well as biomarkers of metabolism ex: bones, kidneys, liver, heart muscle (depending on area of production) (Banfi et al. 2012).

Exercise causes an increase in biomarker concentration in blood. The most useful biomarkers are those that help determine muscle fatigue, since it is possible to indirectly determine muscle energy status. Exercise-induced muscle fatigue is defined as an irreversible decrease in muscle strength (muscle contractility) during work performed in a certain time (peripheral fatigue during exercise) (Gosker et al. 2008, Rainoldi et al. 2008). The main causes for muscle fatigue include acidosis and adenosine-5-triphosphate (ATP) depletion,

induced by increased consumption and/or decreased provision of ATP, reflected by biomarkers of ATP breakdown such as: lactate (LA), ammonia (NH₃), and oxypurines (hypoxanthine (Hx) and xanthine (X)). Another cause of fatigue is overproduction of reactive oxygen species (ROS), reflected by biomarkers such as thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), isoprostanes (FS-IsoP), protein carbonyls (PC), reduced glutathione (GSH), glutathione peroxidase (GPX), catalase (CAT), and total antioxidant capacity (TAC) (Boyas and Guével 2011, Finsterer et al. 2012). Other less defined causes of muscle fatigue are local inflammatory reactions, reflected by biomarkers such as leukocytes (L), tumor necrosis factor α (TNF- α) and interleukins (IL), altered calcium (Ca²⁺) release and handling, disruption of energy pathways (glycogen depletion) and impaired endocrine function of muscle (Boyas and Guével 2011, Finsterer et al. 2012).

Biomarker concentration in muscle, and subsequently in blood depends on intensity, duration, and type of exercise. Due to the lack of a main and single cause of fatigue, there is no “universal” biomarker of muscle fatigue (Finsterer et al. 2012).

At the beginning of exercise, the total adenine nucleotide pool is constant (Hellsten et al. 1999, Stathis et al. 1999, 2006, Ipata and Pesi 2018). As the intensity and duration of exercise increases, the ATP/ADP (adenosine-5-diphosphate) ratio decreases due to excessive ATP consumption, and the total adenine nucleotide pool decreases. The body tries to maintain a constant level of ATP by activating 4 pathways of resynthesis: the aerobic energy system, the anaerobic glycolytic energy system, the anaerobic phosphagen energy system, and the miokinase reaction (Stathis et al. 1999, 2006, Ipata and Pesi 2018). The effect of activation of these energy systems is the production of by-products which accumulate in working muscle, which later enter the bloodstream. They are considered biomarkers of ATP metabolism, indirectly reflecting muscle energy status. These biomarkers include lactate, ammonia and oxypurines (hypoxanthine and xanthine) (Finsterer et al. 2012).

Until now, most research focused on selected biomarkers. There is a lack of research concerning their combined relations and dynamics of change during and after exercise in athletes of different sport specializations in an annual training cycle. The most relevant studies are Banister et al. (1983), Stathis et al. (1994, 2006), Yuan et al. (2002, 2004), Gorostiaga et al. (2014), Ogino et al. (2000), Zieliński et al. (2009, 2011, 2012, 2013a, and 2013b). However, none of these studies analyzed combined changes of LA, NH₃ and purine metabolites (Hx, X, UA (uric acid)). Also, they did not analyze changes of these parameters during exercise and post-exercise, and in an annual training cycle (performing the same test multiple times on the same subjects). The above mentioned authors did not analyze different

athletic groups of different sport specializations (speed-power, endurance, mixed), as well as they did not assess changes in biomarker concentration relative to body composition (muscle mass).

Study Aim

The aim of this study was to determine changes in concentration of ATP metabolism biomarkers (LA, NH₃, and purine metabolites) in blood, during incremental exercise and during recovery in athletes of different sport specializations, different muscle mass levels (study 1) in an annual training cycle (study 2).

Research Hypotheses:

- (a) specialized sport training causes different adaptations which lead to specific dynamics of biomarker release in blood during a standard exercise test and in the post-exercise recovery period,
- (b) a higher level of muscle mass will cause increased biomarker concentration release
- (c) biomarker release dynamics change in an annual training cycle during a standard exercise test and in the post-exercise recovery period.

Methods

Procedures

Tests were carried out in the morning, 3 hours after a light breakfast. Subjects were instructed to not participate in any training sessions at least 24 hours before testing. Body composition analysis as well as an incremental exercise to exhaustion was performed. During all tests, lab/room temperature was maintained at 20-21°C.

Anthropometry and body composition

Body mass (kg) and height (cm) measurements were performed with the use of a stadiometer (SECA 285; SECA, Hamburg, Germany). Body composition analysis was performed using the dual-absorptiometry method (DXA) with the Lunar Prodigy Pro (GE Healthcare, Madison, WI, USA). Skeletal muscle mass (SMM) was calculated based on regression models appropriate for age and sex (Kim et al. 2002).

Cardiorespiratory parameters

Study participants performed an incremental exercise test to exhaustion on a mechanical treadmill (H/P Cosmos Pulsar Sports & Medical, Nussdorf-Traunstein, Germany). To obtain

maximal oxygen consumption (VO_{2max}) values an ergospirometer was used (Cortex Metamax 3B, Leipzig, Germany). Heart rate (bpm) was monitored using a Polar Smart H6 (Polar Electro Oy, Kempele, Finland) heart rate monitor.

Blood sampling

Subjects wore a catheter (BD Venflon Pro 1.3 x 32 mm; Becton Dickinson, Helsingborg, Sweden) patent, from which blood was drawn from one of the antecubital veins. Blood samples were collected at rest, at the end of each 3-minute stage, immediately after exercise, and 5, 10, 15, 20, and 30 minutes into the post-exercise recovery period. Later, a 2.7-ml blood sample was taken into 2 monovettes (S-Monovette 2.7 ml KE; Sarstedt, Nu"mbrecht, Germany) one with a lithium anticoagulant (heparin) and another containing an anticoagulant (EDTA).

Biomarker analysis

Lactate concentration in whole blood was determined using Biosen C-line (EKF diagnostic GmbH, Barleben, Germany) while ammonia was determined using PocketChem BA PA-4140 (Arkay, Kyoto, Japan). Purine metabolites (hypoxanthine, xanthine, uric acid) were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) with UV detection, using the [Smoleński and Yaboub \(1993\)](#) method.

The described testing method was performed once in the first study (all athletes were past their transition phase and beginning their preparatory phase) and four times in the second study (end of the transition phase, beginning of the general preparatory phase, beginning of the special preparatory phase, and beginning of the competitive phase).

Results and their analysis

Article 1

Changes in blood concentration of adenosine triphosphate metabolism biomarkers during incremental exercise in highly trained athletes of different sport specializations, Journal of Strength and Conditioning Research 33(5)/1192–1200, 2019 (first study).

Four groups of athletes participated in the study: sprinters (SP, n=11) specialized in the 100 and 200 m events, aged 24.2 ± 3.2 , and practicing sport for 8.5 ± 2.5 years, endurance athletes (EN, n=16) consisting of triathletes and long distance runners aged 23.4 ± 3.6 , and practicing sport for 8.7 ± 1.9 years, futsal players (FU, n=12) aged 24.5 ± 3.8 , and practicing

sport for 10.0 ± 3.4 years, and amateur runners (AM, n=12) representing the control group aged 27.7 ± 4.1 with no past or current competitive sport history (recreational sports activities 3–5 times per week).

This is the first study to measure ATP metabolism biomarker (LA, NH₃, and purines) concentration in blood at rest, during incremental exercise, and in the post-exercise recovery period with many sampling points in highly trained athletes of different sport specializations. Each group of elite athletes represented a distinct physiological and metabolic training profile dictated by sport discipline. Sprinters represented speed/power athletes engaged in very high-intensity exercise requiring mostly anaerobically dominant energy contribution (Billat et al 2001). Triathletes and distance runners represented endurance athletes performing predominantly aerobic exercise in their training (Beato et al. 2017). Futsal players represented the team sport group characterized by mixed energy system contribution from both aerobic and anaerobic pathways (Naser and Ali 2017).

Our main finding is that the pattern and magnitude of biomarker concentration depends on the specific training profile of highly trained athletes in distinct sport disciplines. At rest, during incremental exercise, and up to 30 minutes into the post-exercise recovery period sprinters had lowest purine metabolism biomarker concentrations, and endurance athletes had lowest ammonia concentrations. For LA during exercise, the lowest concentrations were noted in endurance athletes, except when reaching maximum intensity, where the differences between groups were not significant. In this study, sprinters had significantly greater absolute SMM than all remaining groups. Finally, there were no correlations between SMM and biomarker concentrations at maximal intensity and during recovery within each group.

Lactate and ammonia

LA and ammonia are valuable parameters in monitoring training status in highly trained athletes. Based on their measurement, muscle energy status can be indirectly determined. Determining LA and NH₃ plasma concentration is more favorable during exercise because both increase proportionately to exercise intensity and achieve peak concentration at maximum intensity.

Determining LA threshold is often used in endurance athletes to prescribe appropriate training loads below, at, or above this threshold (Gladden 2004, Goodwin et al. 2007). However, because endurance athletes have LA thresholds at relatively high intensities (percentage of their $\dot{V}O_{2max}$), and because most engage in low- to moderate-intensity exercise

below this threshold, it leaves a large unquantifiable area to prescribe training intensity. Therefore, when quantifying training load at intensities below LA threshold, NH_3 is more intensity sensitive. NH_3 may be used as an indirect indicator of muscle ATP loss during exercise (Gorostiaga et al. 2014) because it increases proportionately to exercise intensity and is more intensity-sensitive at lower intensities below lactate threshold. Plasma NH_3 concentration can be used to evaluate, monitor, and prescribe exercise intensity during clinical exercise tests, conditioning programs, and planning an annual training cycle.

LA is a more adequate marker to assess exercise intensity in sprint-trained and game sport athletes, and mainly during higher-intensity interval-type sessions (HIIT), since it is an indicator of anaerobic glycolysis utilization during exercise (Bompa 1999, Brooks 2007, Beneke et al. 2011).

Purine metabolites

Purine concentration, mirrors adenine nucleotide derivative loss in muscle. Purine metabolites, especially Hx can be used during exercise because Hx increases proportionately to exercise intensity, but it is worthwhile to measure Hx concentration in the post-exercise recovery period to determine total purine derivative loss. This can help assess recovery needs of athletes after high-intensity exercise sessions. Hx level also indicates adaptation to high-intensity exercise because of reduced purine efflux from skeletal muscle and can be viewed as a marker of anaerobic metabolism (Gorostiaga et al. 2012, Zieliński et al. 2013a). Using Hx is particularly valuable in highly trained athletes because commonly used measures such as “ $\dot{V}\text{O}_{2\text{max}}$ ”, “anaerobic threshold” or LA concentration are not sensitive to changes in training status and performance of highly trained athletes. Hx can also be used during tapering periods to determine preparedness and readiness to competition (Zieliński et al. 2009).

Hx and X measurement is recommended directly after exercise or during recovery (preferably at 10 minutes when accumulation is highest). X had similar changes as Hx, however it is important to remember, that it's accumulation takes place in an irreversible reaction from hypoxanthine, hence its determination may have limited diagnostic value. On the other hand, X determination may be important due to the accumulation of reactive oxygen species associated to its production. However, this was not the scope of this study.

Plasma UA concentration did not reach peak concentration during exercise, and even up to 30-min post-exercise, which questions its usefulness as a biomarker of muscle status.

Effect of muscle mass

Finally, there were also no correlations observed between SMM and biomarker concentrations at maximal intensity and recovery in all groups. This indicates that muscle mass levels are not significantly related to magnitude of biomarker release in blood. Because we did not perform muscle biopsies, we were not able to determine biomarker concentrations in muscle and their correlations with blood biomarker levels. However, this may indicate that training level and especially training profile as a result of metabolic adaptations in muscle dictates pattern of biomarker release in blood, not muscle mass itself. Although more muscle mass may indeed produce greater absolute amounts of these biomarkers in muscle, the blood concentration is the combined result of many factors (production and utilization in various metabolic processes). Analysis of biomarker concentration relative to muscle mass (per 1kg SMM) does not have any diagnostic value. Athletes with greater muscle mass have lower biomarkers levels at the same exercise intensity, which could falsely indicate higher training level.

Practical Applications

The magnitude and exact time course of exercise-induced biomarker concentration during a standard progressive exercise until exhaustion is related to training adaptations through specific training profile. Combined measuring of LA, NH₃, and Hx concentration in blood is useful in indirectly reflecting key changes in exercise- and training-induced energy status without the need to use invasive methods such as muscle biopsies. It is essential to note that the 3 metabolites play different roles:

- Determining LA concentration in blood is useful for athletes when performing training sessions using anaerobic glycolysis to a high degree and for athletes in disciplines where LA threshold determination is needed to divide training-intensity zones;
- NH₃ concentration is helpful for monitoring exercise at lower exercise intensities and can be applied for monitoring ATP loss during exercise, for training prescription and evaluation, and can be used by endurance athletes to more precisely monitor exercise at low intensities;
- Purine, especially Hx concentration in blood, is a valuable tool to determine postexercise purine derivative loss. Hx is particularly important in highly trained athletes. Hx can indicate adaptations to anaerobic exercise to check training status in different phases of a 1-year training cycle, especially during tapering periods, regardless of sport discipline.

The differences in plasma purine concentration of metabolites and NH_3 between specifically adapted athletic groups are independent from SMM. Skeletal muscle mass level does not significantly affect magnitude of biomarker release, and thus sport practitioners do not have to consider muscle mass levels when measuring biomarker concentration in blood. Further research should focus on studying how specific training sessions affect individual biomarker response in highly trained athletes.

Article 2

Change in lactate, ammonia and hypoxanthine concentrations in a 1-year training cycle in highly trained athletes: applying biomarkers as tools to assess training status, Journal of Strength and Conditioning Research. August 29, 2019 - Volume Publish Ahead of Print doi: 10.1519/JSC.0000000000003375 (second study).

Four groups of athletes participated in the study: sprinters (SP, n=12) specialized in the 100 and 200 m events, aged 24.1 ± 3.2 , with a training age of 8.4 ± 2.4 years, triathletes (TR, n=11) aged 23.6 ± 3.6 , with a training age of 7.8 ± 1.7 years, futsal players (FU, n=12) aged 24.6 ± 4.5 with a training age of 9.6 ± 4.1 years, and amateur runners (AM, n=13) representing the control group aged 25.4 ± 4.2 with no past or current competitive sport history (physically active 3-5 times per week).

Our research shows, that biomarker concentrations change in an annual training cycle at rest, during exercise, and during recovery. Changes in the analyzed biomarkers depend on training specificity (speed, endurance, mixed). The greatest changes in biomarker concentration in all athletic groups were noted in Hx during maximal accumulation (10 min after exercise) and later during recovery. For NH_3 , the greatest changes were observed at the end of the exercise test, and for LA during the beginning stages of the exercise test. No changes were observed for the AM group in an annual training cycle.

Changes in plasma lactate concentration

Changes in LA between subsequent subphases of an annual training cycle were noted in all athletic groups. However, they occurred between the transition phase, and the remaining three training phases mainly during the exercise portion of the test.

Due to the fact that the AM group did not follow a periodized training plan, and their activity level remained constant (training loads did not change) throughout the year no changes in LA concentration were observed in all four training phases.

Changes in plasma ammonia concentration

Changes in NH₃ concentration were noted in all training phases in the annual training cycle (lowest concentrations in the competitive phase and highest in the transition) in all athletic groups. No changes were observed for the AM group.

Changes in plasma purine metabolite concentration

Changes in Hx concentration were very similar to those obtained for NH₃. No changes were observed for the AM group. A similar pattern was observed for X and UA which is why their time courses were not presented in the results. Furthermore, in terms of UA, despite similar release dynamics, there were no statistically significant differences. This was most likely caused by the fact that obtainment of peak levels of UA concentration were very delayed (past 30 min post-exercise). Therefore, it was concluded that this metabolite has limited diagnostic value.

Biomarkers as tools to assess training status

LA, NH₃, and Hx are all useful in the training process in highly trained athletes and each can be used differently. Determining LA concentration throughout an annual training cycle is useful during the initial stages of exercise in an incremental exercise test to determine initial adaptations to training especially after periods of detraining. Furthermore, LA can be used to determine intensity level, anaerobic threshold, and anaerobic glycolytic contribution during training and can be used to divide intensity zones ([Brooks et al. 2007](#), [Goodwin et al. 2007](#), [Beneke et al. 2011](#)).

Determining NH₃ concentration throughout an annual training cycle can help indicate ATP loss ([Gorostiaga et al. 2012](#), [Green et al. 2014](#)) and indirectly determine adaptations to specific high-intensity exercise ([Itoh and Ohkuwa 1991](#)). The changes in NH₃ concentration in an annual training cycle are the most evident around maximal exercise when AMP deamination is the highest ([Hellsten et al. 1999](#)).

Determining Hx concentration throughout an annual training cycle can help to determine adaptations to anaerobic exercise and can be used as a marker of training status or readiness to competition irrespective of age and sport specialization, but is particularly valuable in highly trained athletes who engage in high-intensity metabolically challenging training sessions. Hx changes at maximum exercise are similar to changes at 30 minutes post-exercise which can indicate that sport practitioners can measure Hx concentration immediately after exercise to obtain diagnostic information regarding training status and

anaerobic adaptations. However, to obtain information regarding maximum concentration or maximal purine derivative loss, blood must be obtained 10 minutes post-exercise.

Hx concentrations showed the most changes between examination periods in athletic groups. This implies that Hx is more sensitive in determining training-induced adaptations in an annual training cycle in highly trained athletes. This could provide sport practitioners information on training status of athletes.

In this study, biomarkers were also analyzed relative to muscle mass. However the results were very similar to their absolute values.

Practical Applications

Changes in LA, NH₃ and Hx concentration can help determine the training status in various phases of an annual training cycle using a standard incremental exercise test protocol. Each metabolite can offer different information:

- LA concentration helps determine initial adaptations to training,
- NH₃ concentration can be used to monitor adaptations to anaerobic exercise especially around maximal exercise, but also is more sensitive to changes at lower exercise intensities, and therefore can be used by endurance disciplines to better monitor changes between training phases,
- Hx concentration changes can identify adaptations especially during periods of training with a large volume of anaerobic training loads, to determine purine derivative loss and to assess training status.

In this exercise test, NH₃ and Hx concentration changes are more sensitive than LA in assessing training status throughout and annual training cycle. For practical reasons measuring Hx concentration immediately post-exercise will have the same diagnostic value as measuring later post-exercise. Although if peak concentration is required, measurement must be performed 10 min post-exercise.

Conclusions

- LA, NH₃, and Hx concentration levels change in an annual training cycle, depending on the type of training and magnitude of training loads induced in different training phases.
- There was no relationship determined between skeletal muscle mass and biomarker concentration.
- Combined measurement of LA, NH₃ and Hx concentration in blood can indirectly reflect exercise and training-induced changes in muscle energy status.
- Changes in NH₃ and Hx concentration are more sensitive in determining training status using an incremental exercise test in long training cycle, compared to LA.

Piśmiennictwo/Bibliography

1. Banfi G, Colombini A, Lombardi G, Lubkowska A. Metabolic Markers in Sports Medicine. *Advances in Clinical Chemistry*. 2012;56:1-54.
2. Banister EW, Allen ME, Mekjavic IB, Singh AK, Legge B, Mutch BJC. The time course of ammonia and lactate accumulation in blood during bicycle exercise. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*. 1983;51(2):195-202.
3. Beato M, Coratella G, Schena F, Hulton AT. Evaluation of the external and internal workload in female futsal players. *Biology of Sport*. 2017;34(3):227-31.
4. Beneke R, Leithauser RM, Ochentel O. Blood Lactate Diagnostics in Exercise Testing and Training. *International Journal of Sports Physiology and Performance*. 2011;6(1):8-24.
5. Billat VL, Demarle A, Slawinski J, Paiva M, Koralsztein JP. Physical and training characteristics of top-class marathon runners. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 2001;33(12):2089-97.
6. Bompa T. Annual training program. In: *Periodization: Theory and Methodology of Training*. Champaign: Human Kinetics; 1999, p. 193–251.
7. Bompa T, Haff G. Annual Training Plan. In: *Periodization: Theory and Methodology of Training*. Champaign: Human Kinetics; 2009. p. 125-137.
8. Brancaccio P, Lippi G, Maffulli N. Biochemical markers of muscle damage. *Clinical Chemistry & Laboratory Medicine*. (2010);48(6):757–67.
9. Brooks GA. Lactate - Link between glycolytic and oxidative metabolism. *Sports Medicine*. 2007;37(4-5):341-3.
10. Boyas S, Guével A. Neuromuscular fatigue in healthy muscle: underlying factors and adaptation mechanisms. *Annals of Physical and Rehabilitation Medicine*. (2011);54(2):88–108.
11. Finsterer J. Biomarkers of peripheral muscle fatigue during exercise. *Bmc Musculoskeletal Disorders*. 2012;13.
12. Gladden LB. Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium. *Journal of Physiology-London*. 2004;558(1):5-30.
13. Goodwin ML, Harris JE, Hernandez A, Gladden LB. Blood lactate measurements and analysis during exercise: a guide for clinicians. *Journal of diabetes science and technology*. 2007;1(4):558-69.
14. Gorostiaga EM, Navarro-Amezqueta I, Calbet JAL, Hellsten Y, Cusso R, Guerrero M, et al. Energy Metabolism during Repeated Sets of Leg Press Exercise Leading to Failure or Not. *Plos One*. 2012;7(7).
15. Gorostiaga EM, Navarro-Amezqueta I, Calbet JAL, Sanchez-Medina L, Cusso R, Guerrero M, et al. Blood ammonia and lactate as markers of muscle metabolites during leg press exercise. *Journal of Strength and Conditioning Research*. 2014;28(10):2775-85.
16. Gosker HR, Schols AM. Fatigued muscles in COPD but no finishing line in sight. *European Respiratory Journal*. 2008;31(4):693–4.
17. Green JM, Hornsby JH, Pritchett RC, Pritchett K. Lactate Threshold Comparison in Anaerobic vs Aerobic Athletes and Untrained Participants. *International Journal of Exercise Science*. 2014;7(4):329-38.
18. Hellsten Y, Richter EA, Kiens B, Bangsbo J. AMP deamination and purine exchange in human skeletal muscle during and after intense exercise. *Journal of Physiology-London*. 1999;520(3):909-20.
19. Itoh H, Ohkuwa T. Ammonia and lactate in the blood after short-term sprint exercise. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*. 1991;62(1):22-5.

20. Ipata P, Pesì R. Metabolic interaction between purine nucleotide cycle and oxypurine cycle during skeletal muscle contraction of different intensities: a biochemical reappraisal. *Metabolomics*. 2018;14(4).
21. Kim J, Wang ZM, Heymsfield SB, Baumgartner RN, Gallagher D. Total-body skeletal muscle mass: estimation by a new dual-energy X-ray absorptiometry method. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2002;76(2):378-83.
22. Naser N, Ali A, Macadam P. Physical and physiological demands of futsal. *Journal of Exercise Science & Fitness*. 2017;15(2):76-80.
23. Ogino K, Kinugawa T, Osaki S, Kato M, Endoh A, Furuse Y, et al. Ammonia response to constant exercise: Differences to the lactate response. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2000;27(8):612-7.
24. Rainoldi A, Gazzoni M, Merletti R, Minetto MA. Mechanical and EMG responses of the vastus lateralis and changes in biochemical variables to isokinetic exercise in endurance and power athletes. *Journal of Sports Sciences* 2008;26(3):321–331.
25. Smolenski RT, Yacoub MH. Liquid-chromatographic evaluation of purine production in the donor human heart during transplantation. *Biomedical Chromatography*. 1993;7(4):189-95.
26. Stathis CG, Carey MF, Hayes A, Garnham AP, Snow RJ. Sprint training reduces urinary purine loss following intense exercise in humans. *Applied Physiology Nutrition and Metabolism-Physiologie Appliquee Nutrition Et Metabolisme*. 2006;31(6):702-8.
27. Stathis CG, Febbraio MA, Carey MF, Snow RJ. Influence of sprint training on human skeletal-muscle purine nucleotide-metabolism. *Journal of Applied Physiology*. 1994;76(4):1802-9.
28. Stathis CG, Zhao S, Carey MF, Snow RJ. Purine loss after repeated sprint bouts in humans. *Journal of Applied Physiology*. 1999;87(6):2037-42.
29. Yuan Y, Chan KM. A longitudinal study on the ammonia threshold in junior cyclists. *British Journal of Sports Medicine*. 2004;38(2):115-9.
30. Zielinski J, Krasinska B, Kusy K. Hypoxanthine as a Predictor of Performance in Highly Trained Athletes. *International Journal of Sports Medicine*. 2013b;34(12):1079-86.
31. Zielinski J, Kusy K. Training-induced adaptation in purine metabolism in high-level sprinters vs. triathletes. *Journal of Applied Physiology*. 2012;112(4):542-51.
32. Zielinski J, Kusy K, Rychlewski T. Effect of Training Load Structure on Purine Metabolism in Middle-Distance Runners. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 2011;43(9):1798-807.
33. Zielinski J, Kusy K, Slominska E. Alterations in purine metabolism in middle-aged elite, amateur, and recreational runners across a 1-year training cycle. *European Journal of Applied Physiology*. 2013a;113(3):763-73.
34. Zielinski J, Rychlewski T, Kusy K, Domaszewska K, Laurentowska M. The effect of endurance training on changes in purine metabolism: a longitudinal study of competitive long-distance runners. *European Journal of Applied Physiology*. 2009;106(6):867-76.

Streszczenie

Celem badań było określenie zmian w stężeniu biomarkerów metabolizmu ATP (LA, NH_3 i metabolitów puryn) we krwi, podczas stopniowanego wysiłku oraz w fazie restytucji u sportowców o odmiennym profilu treningowym, różnej masie mięśniowej (artykuł 1) w rocznym cyklu treningowym (artykuł 2). Założono, że: (a) wyspecjalizowany trening sportowy (szybkościowo-siłowy, wytrzymałościowy, mieszany) powoduje odmienne adaptacje prowadzące do specyficznej dynamiki uwalniania biomarkerów do krwi podczas standardowego wysiłku oraz w okresie powysiłkowej restytucji, (b) wyższa masa mięśniowa będzie powodować zwiększone uwalnianie analizowanych biomarkerów, (c) w rocznym cyklu treningowym zmienia się dynamika uwalniania biomarkerów do krwi podczas standardowego wysiłku oraz w okresie powysiłkowej restytucji.

W badaniu uczestniczyły cztery grupy sportowców: sprinterzy (SP), sportowcy wytrzymałościowi (EN w artykule 1) lub triathloniści (TR w artykule 2), futsaliści (FU) oraz grupa biegaczy amatorskich (AM). Stężenie amoniaku (NH_3) i mleczanu (LA) we krwi pełnej oraz metabolitów puryn w osoczu: hipoksantyny (Hx), ksantyny (X), kwasu moczowego (UA) określano w spoczynku, podczas wysiłku o wzrastającej intensywności na bieżni mechanicznej oraz podczas restytucji (5, 10, 15, 20 i 30 min po wysiłku) w 4 fazach rocznego cyklu treningowego. Masę mięśni szkieletowych (SMM) oszacowano na podstawie wzoru [Kim i wsp. \(2002\)](#).

W spoczynku, podczas wysiłku o wzrastającej intensywności oraz w okresie restytucji powysiłkowej sprinterzy mieli najniższe stężenie puryn, a sportowcy wytrzymałościowi najniższe stężenie amoniaku. Najniższe stężenie LA odnotowano u sportowców wytrzymałościowych podczas wysiłku. Sprinterzy mieli najwyższe wartości SMM w porównaniu do zawodników innych grup. Nie zaobserwowano korelacji pomiędzy SMM, a stężeniem biomarkerów podczas maksymalnej intensywności wysiłku oraz w czasie restytucji w żadnej z badanych grup. U zawodników odnotowano zmiany stężenia LA pomiędzy kolejnymi podokresami rocznego cyklu treningowego, we wszystkich grupach sportowych. Jednak wystąpiły one tylko pomiędzy okresem przejściowym, a pozostałymi trzema okresami treningowymi w punktach pomiarowych występujących w fazie wysiłkowej testu. Zmiany stężenia NH_3 i Hx odnotowano kolejno we wszystkich badanych okresach cyklu treningowego (najniższe w okresie startowym, najwyższe w okresie przejściowym) u wszystkich grup sportowych. Analizy zmiany stężeń biomarkerów w przeliczeniu na masę mięśniową w rocznym cyklu treningowym były zbliżone do tych wykonanych na wartościach bezwzględnych.

Stężenia LA, NH_3 i Hx ulegają zmianie w rocznym cyklu treningowym, w zależności od typu treningu oraz wielkości obciążeń treningowych zastosowanych w różnych okresach cyklu. Nie stwierdzono związku pomiędzy masą mięśni szkieletowych a stężeniem biomarkerów. Łączny pomiar stężenia LA, NH_3 i Hx we krwi może w pośredni sposób odzwierciedlać zmiany w statusie energetycznym mięśni wywołanych wysiłkiem i treningiem. Zmiany stężeń NH_3 i Hx są bardziej wrażliwe w porównaniu do LA na zmiany statusu treningowego ocenianego testem wysiłkowym w długich cyklach treningowych.

Abstract

The aim of these studies was to determine changes in biomarker (LA, NH₃, purine metabolites) concentration in blood during graded exercise and recovery in highly trained athletes of different training profiles and levels of muscle mass (study 1) in an annual training cycle (study 2). It was hypothesized that: (a) high-level specialized sport training (speed-power, endurance, mixed) causes different adaptations that induce specific biomarker release dynamics in blood during standard exercise and recovery, (b) greater skeletal muscle mass will cause greater biomarker release and (c) biomarker concentration in blood during graded exercise and recovery changes throughout an annual training cycle.

The study included 4 groups of athletes: sprinters (SP), endurance athletes (EN in study 1) or triathletes (TR in study 2), futsal players (FU), and amateur runners (AM). Hypoxanthine (Hx), xanthine (X), uric acid (UA), ammonia (NH₃), and lactate (LA) concentrations were determined at rest, during an incremental treadmill exercise test (every 3 minutes), and during recovery (5, 10, 15, 20, and 30 minutes after exercise) in 4 phases of an annual training cycle. Hx, X, and UA concentration was determined from plasma, while LA and NH₃ from whole blood, while muscle mass was calculated based on regression models appropriate for age and sex (Kim et al. 2002).

At rest, during incremental exercise, and up to 30 minutes into the post-exercise recovery period, sprinters had the lowest Hx, X, and UA concentrations, and endurance athletes had the lowest NH₃ concentrations. For LA during exercise, the lowest concentrations were noted in endurance athletes. Sprinters had the highest SMM values compared to other groups. There were no significant correlations observed between skeletal muscle mass and biomarker concentration at maximal intensity and recovery in any group. Changes in LA concentration between training phases in an annual training cycle were noted in all athletic groups. However, they only took place between the transition phase and the remaining three periods during the exercise portion of the test. Changes in NH₃ and Hx concentration were noted in all training phases (lowest in the competitive phase, and highest in the transition) in all athletic groups. Analysis of biomarker concentration changes relative to muscle mass in an annual training cycle were very similar to absolute values.

LA, NH₃, and Hx concentrations change in an annual training cycle depending on training type and magnitude of training loads used in different training phases. No relationship was observed between skeletal muscle mass and biomarker concentration. Combined measurement of LA, NH₃, and Hx concentration in blood can indirectly reflect changes in muscle training status induced by exercise and training. When assessing training status using an incremental exercise test throughout an annual training cycle, NH₃ and Hx concentration changes are more sensitive compared with LA.

Załączniki

- Oświadczenia współautorów
- Publikacja nr 1
- Publikacja nr 2

mgr Michał Włodarczyk
Akademia Wychowania Fizycznego
Wydział Wychowania Fizycznego, Sportu i Rehabilitacji
Zakład Lekkiej Atletyki i Przygotowania Motorycznego

OŚWIADCZENIE

Mój udział w powstawaniu niżej wymienionej pracy polegał na: przeprowadzeniu badań, zebraniu materiału biologicznego, przeprowadzeniu i analizie wyników testów wysiłkowych, analizie piśmiennictwa, przygotowaniu rycin oraz tabel, pisaniu manuskryptu.

Change in lactate, ammonia and hypoxanthine concentrations in a 1-year training cycle in highly trained athletes: applying biomarkers as tools to assess training status
Journal of Strength and Conditioning Research.
August 29, 2019 - Volume Publish Ahead of Print
doi: 10.1519/JSC.0000000000003375

Michał Włodarczyk

Potwierdzenie współautorów

Kusy, K. 

Słomińska, E. 

Kraśński, Z. 

KIEROWNIK
Kliniki Chirurgii Naczyniowej,
Wewnętrzznacyniowej, Angiologii i Flebologii

Prof. dr hab. med. Zbigniew Kraśński

Zieliński, J. 

mgr Michał Włodarczyk
Akademia Wychowania Fizycznego
Wydział Wychowania Fizycznego, Sportu i Rehabilitacji
Zakład Lekkiej Atletyki i Przygotowania Motorycznego

OŚWIADCZENIE

Mój udział w powstawaniu niżej wymienionej pracy polegał na: przeprowadzeniu badań, zebraniu materiału biologicznego, przeprowadzeniu i analizie wyników testów wysiłkowych, analizie piśmiennictwa, przygotowaniu rycin oraz tabel, pisaniu manuskryptu.

Changes in blood concentration of adenosine triphosphate metabolism biomarkers during incremental exercise in highly trained athletes of different sport specializations.

Journal of Strength and Conditioning Research 33(5): 1192–1200. May 2019. doi: 10.1519/JSC.0000000000003133

Michał Włodarczyk

Potwierdzenie współautorów:

Kusy, K. 

Słomińska, E. 

Krasiński, Z. 

Zieliński, J. 

PROF. DR HAB. MED. ZBIGNIEW KRASIŃSKI
Katedra Chirurgii Naczyniowej,
Chirurgii Nowej, Angiologii i Flebologii

Prof. dr hab. med. Zbigniew Krasiński