

**Akademia Wychowania Fizycznego i Sportu
im. Jędrzeja Śniadeckiego w Gdańsku**



ROZPRAWA DOKTORSKA

mgr Magdalena Kochanowicz

**WPLYW ZDALNEGO HARTOWANIA PRZEZ NIEDOKRWIENIE
KOŃCZYNY DOLNEJ NA ZMIANY WYBRANYCH MARKERÓW
STANU ZAPALNEGO INDUKOWANYCH MAKSYMALNYM
WYSIŁKIEM ANAEROBOWYM**

Promotor :

prof. dr hab. Jędrzej Antosiewicz

Gdańsk 2022

Praca zrealizowana w ramach projektu finansowanego przez MNiSW:
Grant N RSA4 06754

*Nowe metody wspomagania zawodników wybranych dyscyplin sportowych w okresie
bezpośredniego przygotowania startowego.*

Panu prof. dr. hab. Jędrzejowi Antosiewiczowi

*promotorowi niniejszej pracy, składam serdeczne podziękowania za udostępnienie ciekawego
tematu pracy doktorskiej oraz profesjonalną i życzliwą pomoc merytoryczną.*

SPIS TREŚCI

WPROWADZENIE	7
I. PROBLEM BADAWCZY W LITERATURZE.....	13
1.1. WPŁYW HARTOWANIA PRZEZ NIEDOKRWIENIE NA FUNKCJE I MOŻLIWOŚCI WYSIŁKOWE ORGANIZMU	13
1.2. ZMIANY ADAPTACYJNE INDUKOWANE PRZEZ WYSIŁEK FIZYCZNY- ROLA MIOKIN	19
II. METODOLOGIA BADAŃ WŁASNYCH	38
2.1. CEL BADAŃ	38
2.2. PYTANIA BADAWCZE	38
2.3. HIPOTEZY BADAWCZE	39
2.4. CHARAKTERYSTYKA BADANYCH OSÓB	39
2.5. METODY I TECHNIKI BADAWCZE	40
2.6. NARZĘDZIA BADAWCZE.....	40
2.6.1. Pomiary antropometryczne	40
2.6.2. Pomiar wydolności beztlenowej kończyn dolnych	40
2.6.3. Analiza krwi i oznaczenia biochemiczne	41
2.7. PROCEDURY BADAŃ	42
2.7.1. Pierwszy etap badań.....	42
2.7.2. Drugi etap badań	42
2.7.3. Trzeci etap badań	44
2.7.3. Czwarty etap badań.....	45
2.8. PROTOKÓŁ ZDALNEGO HARTOWANIA PRZEZ NIEDOKRWIENIE (RIPC)	46
2.9. ANALIZY STATYSTYCZNE	47
III. WYNIKI BADAŃ	49
3.1. ANALIZA BUDOWY I SKŁADU CIAŁA	50
3.1.1. Charakterystyka budowy i składu ciała przed jednorazową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie	50
3.1.2. Charakterystyka budowy i składu ciała przed i po 10 dniowej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie	51
3.2. ANALIZA POZIOMU MAKSYMALNYCH MOŻLIWOŚCI ANAEROBOWYCH	52
3.2.1. Wpływ jednorazowej procedury zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej na poziom maksymalnych możliwości anaerobowych	52
3.2.2. Wpływ 10 dniowej procedury zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej na poziom maksymalnych możliwości anaerobowych	54
3.3. ANALIZA STĘŻENIA KWASU MLEKOWEGO I GLUKOZY WE KRWI	56

3.3.1. Wpływ jednorazowej procedury zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej na zamiany stężenia kwasu mlekowego i glukozy we krwi indukowanych maksymalnym wysiłkiem anaerobowym	56
3.3.2. Wpływ maksymalnego wysiłku anaerobowego na zamiany stężenia kwasu mlekowego i glukozy przed 10 dniową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej	58
3.3.3. Wpływ 10 dniowej procedury zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej na zamiany stężenia kwasu mlekowego i glukozy we krwi indukowanych maksymalnym wysiłkiem anaerobowym	59
3.4. ANALIZA STĘŻENIA MARKERÓW STANU ZAPALNEGO	61
3.4.1. Wpływ jednorazowej procedury zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej na zmiany stężenia wyjściowego markerów stanu zapalnego we krwi	61
3.4.2. Wpływ jednorazowej procedury zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej na zmiany stężenia markerów stanu zapalnego we krwi indukowanych maksymalnym wysiłkiem anaerobowym	65
3.4.3. Wpływ maksymalnego wysiłku anaerobowego na zamiany stężenia markerów stanu zapalnego we krwi przed 10 dniową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej	69
3.4.4. Wpływ 10 dniowej procedury zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej na zmiany stężenia wyjściowego markerów stanu zapalnego we krwi	73
3.4.5. Wpływ 10 dniowej procedury zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej na zmiany stężenia markerów stanu zapalnego we krwi indukowanych maksymalnym wysiłkiem anaerobowym	76
IV. DYSKUSJA	81
V. WNIOSKI	92
Streszczenie	94
Piśmiennictwo	96
Spis tabel i rycin	105
Aneks	108

WYKAZ SKRÓTÓW

ANG	z ang. <i>angiogenin</i> , angiogenina
ANGPT	z ang. <i>angiopoietin</i> , angiopoetyna
ANGPT1	z ang. <i>angiopoietin 1</i> , angiopoetyna 1
ANGPT2	z ang. <i>angiopoietin 2</i> , angiopoetyna 2
ATP	z ang. <i>adenosine triphosphate</i> , adenozyntrójfosforan
BAIBA	z ang. <i>β-aminoisobutyric acid</i> , kwas β-aminoizomasłowy
BDNF	z ang. <i>brain-derived neurotrophic factor</i> , neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego
BFR	z ang. <i>blond flowrestriction</i> , ograniczenie przepływu krwi
CLC	z ang. cytokina kardiotrofinopodobna
CNTF	z ang. <i>ciliary neurotrophic factor</i> , rzęskowy czynnik neurotroficzny
CSIF	z ang. <i>cytokine synthesis inhibitory factor</i> , czynnik hamujący syntezę cytokin
CT-1	z ang. <i>cardiotrophin 1</i> , kardiotrofina 1
DAX	z ang. <i>dual-energy X-ray absorptiometry</i> , dwuenergetycznej absorpcjometrii rentgenowskiej
ECM	z ang. <i>extracellular matrix ECM</i> , macierz zewnątrzkomórkowa
EMG	z ang. <i>electromyography</i> , aktywność elektryczną mięśni
EPO	z ang. <i>erythropoietin</i> , erytropoetyna
FGF2	z ang. <i>fibroblast growth factor</i> , czynnik wzrostu fibroblastów 2
FSTL-1	z ang. <i>follicle-stimulating-like 1</i> , folistatyna 1
FTH	z ang. <i>ferritin H</i> , ferytyna ciężka
FTL	z ang. <i>ferritin L</i> , ferytyna lekka
G	z ang. <i>glucose</i> , glukoza
G-CSF	z ang. <i>granulocyte colony-stimulating factor</i> , czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów,
GDF-15	z ang. <i>growth differentiation factor-15</i> , czynnik różnicowania wzrostu 15
GLUT4	z ang. <i>glucose transporter-4</i> , transportera glukozy typu 4
GM-CSF,	z ang. <i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> , czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów
GP130	z ang. <i>glycoprotein 130</i> , glikoproteina 130
GPAQ	z ang. <i>global physical activity questionnaire</i> , międzynarodowy kwestionariusz aktywności fizycznej
GPAQ	z ang. <i>Global Physical Activity Questionnaire</i> , Globalny Kwestionariusz Aktywności Fizycznej
HIV	z ang. <i>human immunodeficiency virus</i> , ludzki wirus niedoboru immunologicznego
HT-29	z ang. <i>colorectal cancer cell lines</i> , komórki ludzkiego raka jelita grubego
IFN	z ang. <i>Interferons</i> , interferon
IFN-γ	z ang. <i>Interferons gamma</i> , interferon gamma
IGF1	z ang. <i>insulin-like growth factor</i> , insulinopodobny czynnik wzrostu
IL-1α	z ang. <i>interleukin-1 alfa</i> , interleukina 1 alfa
IL-1β	z ang. <i>interleukin-1 beta</i> , interleukina 1 beta
IL-4	z ang. <i>interleukin 4</i> , interleukina 4
IL-6	z ang. <i>interleukin 6</i> , interleukina 6
IL-6Rα	z ang. <i>interleukin-6 receptor alfa</i> , receptor Interleukiny 6 alfa
IL-8	z ang. <i>interleukin 8</i> , interleukina 8
IL-10	z ang. <i>interleukin 10</i> , interleukina 10
IL-11	z ang. <i>interleukin 11</i> , interleukina 11
IL-12	z ang. <i>interleukin 12</i> , interleukina 12

IL-15	z ang. <i>interleukin 15</i> , interleukina 15
IL-18	z ang. <i>interleukin 18</i> , interleukina 18
IL-27	z ang. <i>Interleukin 27</i> , interleukina 27
IPC	z ang. <i>ischemic preconditioning</i> , hartowanie przez niedokrwienie
JAK-STAT	z ang. <i>JAK-STAT signaling pathway</i> , ścieżka sygnalizacyjna JAK-STAT
Komórki B	z łac. <i>bursa Fabricii</i> , torebka Fabrycjusza-limfocyty B
LA	z ang. <i>lactic acid</i> , kwas mlekowy
LIF	z ang. <i>leukaemia inhibitory factor</i> , czynnik hamujący białaczkę
MCF-7	z ang. <i>Michigan Cancer Foundation-7</i> , komórki raka piersi
MCP1	z ang. <i>monocyte chemoattractant protein-1</i> , białko chemotaktyczne monocytów
M-CSF	z ang. <i>macrophage colony-stimulating factor</i> , czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów
MIC-1	z ang. <i>macrophage inhibitory cytokine-1</i> , czynnik hamujący makrofagi-1
mmHg	z ang. <i>millimetres of mercury</i> , milimetrach słupa rtęci
MMP	z ang. <i>matrix metalloproteinases</i> , metaloproteinazy macierzy
MMP-9	z ang. <i>matrix metalloproteinases 9</i> , metaloproteinazy macierzy 9
Mn-SOD	z ang. <i>manganese superoxide dismutase</i> , dysmutazy ponadtlenkowej manganu
MRI	z ang. <i>magnetic resonance imaging</i> , technika rezonansu magnetycznego
mRNA	z ang. <i>messenger ribonucleic acid</i> , matrycowe RNA
NK	z ang. <i>natural killer</i> , komórki limfocyty NK
NLPZ	z pol. <i>niesteroidowe leki przeciwzapalne</i>
NO	z ang. <i>nitric oxide</i> , tlenek azotu
OSM	z ang. <i>onkosatin M</i> , onkosatyna M
OSMR β	z ang. <i>onkosatin M receptor beta</i> , receptor beta onkostatyny M
PAF	z ang. <i>platelet-activating factor</i> , czynnik aktywujący płytki krwi
PPAR- α	z ang. <i>peroxisome proliferator-activated receptor alpha</i> , receptor alfa aktywowany przez proliferatory peroksysomów
RIPC	z ang. <i>remove ischemic preconditioning</i> , zdalne hartowanie przez niedokrwienie
SHAM	z ang. <i>Sham-controlled procedure</i> , pozorowana procedura kontrolowana
SpO ₂	z ang. <i>oxygen saturation</i> , wysyceniem tlenem krwi tętniczej
STAT 3	z ang. <i>signal transducer and activator of transcription 3</i> , aktywator transkrypcji
TFRC	z ang. <i>transferrin receptor 1</i> , receptor transferyny
TGF- β 1	z ang. <i>transforming growth factor β1</i> , transformujący czynnik wzrostu beta 1
Th-1	z ang. <i>T helper cells</i> , komórki limfocytów T pomocniczych
Th-2	z ang. <i>T helper cells</i> , komórki limfocytów T pomocniczych
Tie1	z ang. <i>receptor tyrosine kinase inhibitors</i> , receptor kinazy tyrozynowej 1
Tie2	z ang. <i>receptor tyrosine kinase inhibitors</i> , receptor kinazy tyrozynowej 2
TIMP-1	z ang. <i>metallopeptidase inhibitor 1</i> , tkankowy inhibitor metaloproteinazy1
TNF	z ang. <i>tumor necrosis factor</i> , czynnik martwicy nowotworów
TNF- α	z ang. <i>tumor necrosis factor α</i> , czynnik martwicy nowotworów alfa
tRNA	z ang. <i>transfer RNA</i> , transporter RNA
USG Doppler	z ang. <i>doppler ultrasound</i> , badanie ultrasonograficzne Dopplerowskie
VEGF	z ang. <i>vascular endothelial growth factor</i> , czynnik wzrostu śródbłónka naczyńniowego
VO ₂ max	z ang. <i>maximum oxygen uptake</i> , maksymalny pobór tlenu
WAnT	z ang. <i>Wingate Anaerobic Test</i> , test maksymalnych możliwości anaerobowych
WHO	z ang. <i>World Health Organization</i> , Międzynarodowa Organizacja Zdrowia

WPROWADZENIE

Jednym z największych wyzwań dla trenerów i naukowców zajmujących się sportem jest identyfikacja egzogennych strategii optymalizacji treningu i wyników sportowych, szczególnie u zawodników, których efekty przystosowawcze są trudniejsze do wywołania (Cheng, Kuo et al. 2021). Dlatego też poszukiwane są coraz to nowsze rozwiązania między innymi z zakresu oddziaływania tkankowego mające na celu poprawę ich zdolności do realizacji funkcji szczególnie w zakresie zwiększenia możliwości wysiłkowych organizmu. Coraz większe zainteresowanie naukowców dostrzega się w badaniach dotyczących hartowania przez niedokrwienie (ang. *ischemic preconditioning* - IPC), które największe zastosowanie znalazło w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu (Hausenloy and Yellon 2008; Lalonde and Curnier 2015; Incognito, Burr et al. 2016; Billah, Ridiandries et al. 2019). Hartowanie przez niedokrwienie to krótkotrwałe epizody niedokrwienia wywołane mechanicznie i powodujące niedotlenienie w obrębie poddanych temu działaniu tkanek. Stanowi to pierwszą fazę hartowania przez niedokrwienie nazywaną okluzją naczyniową. Druga faza IPC to reperfuzja, która następuje z chwilą przywrócenia krążenia, przyczyniając się w sposób istotny do wzrostu przepływu krwi w tętnicy (Kimura, Ueda et al. 2007; Shimizu, Konstantinov et al. 2007). Od czasu odkrycia tego zjawiska przez Murry, Jennings et al. (1986) liczne prace naukowe koncentrowały się głównie na klinicznej użyteczności procedury hartowania przez niedokrwienie. W badaniach Murry, Jennings et al. (1986) wykonanych na modelu psiego zawału mięśnia sercowego udowodniono po raz pierwszy skuteczność kardioprotekcyjną tej procedury w prewencji rozległości indukowanych zawałów mięśnia sercowego (spadek rozmiaru zawału o 25%) (Murry, Jennings et al. 1986). Liczne badania nad hartowaniem przez niedokrwienie wykazały także przydatność kliniczną stosowania tej procedury w ochronie kardiomiocytów podczas przedłużających się epizodów niedotlenienia, mogących występować zarówno podczas operacji serca, zawału mięśnia sercowego bądź w przebiegu chorób sercowo-naczyniowych i rekonwalescencji pacjentów po przeprowadzonych zabiegach kardiologicznych (Murry, Jennings et al. 1986; Hausenloy and Yellon 2008; Mudaliar, Rayner et al. 2017; Botker, Lassen et al. 2018; Billah, Ridiandries et al. 2020). Zjawisko to pod względem metabolicznym i funkcjonalnym przyczynia się do zwiększenia tolerancji tkanek na wystąpienie ewentualnych epizodów niedokrwiennych w przyszłości. Ma to szczególne znaczenie zwłaszcza u pacjentów ze zmianami zatorowo-zakrzepowymi naczyń krwionośnych oraz czynną chorobą wieńcową, gdzie w sposób istotny procedura IPC może przyczyniać się do zmniejszenia konsekwencji nagłych epizodów

niedokrwiennych (Murry i wsp. 1986; Li i wsp. 1990; Kuzuya i wsp. 1993; Parratt. 1994; Bushel i wsp. 2002).

Praca Murry, Jennings et al. (1986) dała początek kolejnym badaniom i modyfikacji metody hartowania w oparciu o indukowanie epizodów niedokrwienia w odległych od niedokrwionego obszaru tkankach i narządach. Jedną z pierwszych prac ukazujących taki model oddziaływania była praca opublikowana w 1993 roku autorstwa Przyklenk, Bauer et al. (1993). Zaobserwowane w niej zjawisko nazwano zdalnym hartowaniem przez niedokrwienie (z ang. *Remote Ischemic Preconditioning- RIPC*). Odkrycie to potwierdziło hipotezę, że wywołanie krótkich epizodów okluzji i reperfuzji w obszarze okalającym tętnicę wieńcową może zmniejszyć późniejszy rozmiar zawału mięśnia sercowego. Model oddziaływania określany jako RIPC został rozszerzony nie tylko w koncepcji oddziaływania kardiologicznego, ale próbowano także określić skuteczność tej metody w odniesieniu do oddziaływania na różne narządy i tkanki. Miało to na celu zaprezentowanie strategii ochrony między narządowej przed szkodliwymi skutkami ostrego uszkodzenia niedokrwienno-reperfuzyjnego, ale również przed epizodami niedokrwienia związanymi z chwilowym zaburzeniem przepływu krwi (Hausenloy and Yellon 2008). Model oddziaływania zaproponowany przez Przyklenk, Bauer et al. (1993) był jednak obarczony poważnym ograniczeniem. Konieczne było w nim wykorzystanie narządu wewnętrznego (już niekardiologicznego) jako zdalnego bodźca poddanego hartowaniu. Wymagało to w dalszym ciągu interwencji medycznej w postaci zabiegu chirurgicznego celem indukowania procedury niedokrwienia. Tym czasem do klinicznego zastosowania strategii kardioprotekcyjnej potrzebna jest mniej inwazyjna metoda, której efekty nie były by tak obciążające dla organizmu. Postęp w tym kierunku poczynili Birnbaum, Hale et al. (1997) udowadniając, iż krótkotrwałe ograniczenia przepływu krwi do mięśni szkieletowych kończyny dolnej przy zastosowaniu kołnierza sfigmomanometru i stymulacja nim mięśnia brzuchatego łydki przed zamknięciem tętnicy wieńcowej przyczyniała się do spadku rozległości zawału mięśnia sercowego królika nawet o 65% (Birnbaum, Hale et al. 1997; Hausenloy and Yellon 2008). W innym badaniu zaobserwowano, że procedura RIPC może chronić nie tylko ludzkie serce, ale także poprawić krążenie wieńcowe (Botker, Lassen et al. 2018). Ponad to w dalszych publikacjach wykazano korzystny wpływ RIPC na stan zdrowia pacjentów obciążonych chorobą wieńcową. w statystykach klinicznych zauważono u badanych osób poprawę związaną z częstością występowania: zawału mięśnia sercowego, udaru, niewydolności nerek oraz długością pobytu na oddziale intensywnej terapii (Botker, Kharbanda et al. 2010; Botker, Lassen et al. 2018; Gaspar, Lourenco et al. 2018; Billah, Ridiandries et al. 2020). Co więcej,

codziennie stosowanie procedury RIPC po przebytych zawale mięśnia sercowego zapobiegło niekorzystnej przebudowie lewej komory serca (Wei, Xin et al. 2011). Zdalne hartowanie przez niedokrwienie na dobre znalazło swoje zastosowanie w kardiochirurgii jako procedura wykonywana przed planowanymi operacjami serca, w których czas urazu niedokrwienno jest wydłużony w sposób kontrolowany (Billah, Ridiandries et al. 2019). Kolejne badania wykazały, że RIPC chroni wątrobę (Kimura, Ueda et al. 2007), mózg (Przyklenk, Bauer et al. 1993) i serce (Griffin, Hughes et al. 2019) przed uszkodzeniem niedokrwienno-reperfuzyjnym mięśnia sercowego poprzez indukcję autofagii (Przyklenk, Bauer et al. 1993; Kimura, Ueda et al. 2007; Griffin, Hughes et al. 2019). Powyższe odkrycia stanowią potwierdzenie ogólnoustrojowej i międzynarządowej formy ochrony przed uszkodzeniem niedokrwienno-reperfuzyjnym.

Skuteczność procedur RIPC w naukach medycznych spowodowała wzrost zainteresowania tą metodą innych dyscyplin, m.in. kultury fizycznej, gdzie przemiany biochemiczno-fizjologiczne mają przekładać się na poprawę możliwości realizowanych zadań ruchowych. W późniejszym czasie nowo opracowaną metodę, nieinwazyjnego hartowania przez niedokrwienie, wykorzystano w badaniach na modelu zwierzęcym, wykazując poprawę siły i kurczliwości mięśni szkieletowych. Ponad to stwierdzono także zmniejszenie zmęczenia szczurów po zastosowaniu procedury IPC (Lawson and Downey 1993). Kolejni badacze Pang, Neligan et al. (1997) również wykazali, że IPC może chronić mięśnie szkieletowe świni poprzez protekcyjny wpływ na zużycie energii w czasie trwania intensywnego wysiłku fizycznego. Wyniki tych badań zainspirowały de Groot, Thijssen et al. (2010) do przeprowadzenia eksperymentu, który miał odpowiedzieć na pytanie, czy hartowanie przez niedokrwienie będzie miało wpływ na wydolność fizyczną i maksymalne zużycie tlenu u ludzi. Wykonana w tym badaniu procedura IPC na obu kończynach dolnych (zacisk mankietu sfigmomanometru na poziomie 220 mmHg) wpłynęła korzystnie na uzyskane wyniki w teście wysiłkowym wykonanym na ergometrze rowerowym w populacji trenujących zawodowo rowerzystów. Powtarzane trzykrotnie 5 minutowe okresy okluzji, przeplatane 5 minutowymi okresami reperfuzji przyniosły istotny wzrost maksymalnego zużycia tlenu z 56,8 do 58,4 ml /min na kg ($P=0,003$) oraz maksymalnej mocy wyjściowej z 366 do 372 W ($P=0,05$) (de Groot, Thijssen et al. 2010). Potwierdzenie założonej hipotezy badawczej spowodowało, że praca ta stała się punktem wyjścia dla wielu rozważań z zakresu nauk o kulturze fizycznej, w których model hartowania przez niedokrwienie stanowi główną metodę oddziaływania na tkanki i narządy. Uzyskane wówczas rezultaty badań wytyczyły nową ścieżkę ukierunkowaną na zwiększanie możliwości wysiłkowych w zakresie pływania

(Jean-St-Michel, Manlhiot et al. 2011), biegania (Bailey, Jones et al. 2012), jazdy na rowerze (Lalonde and Curnier 2015; Patterson, Bezodis et al. 2015), czy też ćwiczeń siłowych (Marocolo, Marocolo et al. 2016; Marocolo, Willardson et al. 2016).

Wyniki badań dotyczących wpływu hartowania przez niedokrwienie na możliwości wysiłkowe człowieka okazują się jednak niejednoznaczne. W niektórych pracach nie wykazano korzystnego wpływu procedury hartowania przez niedokrwienie na poziom możliwości wysiłkowych organizmu (Gibson, Mahony et al. 2015; Lalonde and Curnier 2015; Valenzuela, Martin-Candilejo et al. 2021). Porównując różne badania, zauważyć można powtarzający się schemat IPC polegający głównie na wykonaniu jednorazowej procedury trzykrotnej lub czterokrotnej okluzji i reperfuzji w obszarze jednej kończyny lub obu kończyn zaangażowanych w wysiłek fizyczny (de Groot, Thijssen et al. 2010; Crisafulli, Tangianu et al. 2011; Bailey, Jones et al. 2012; Gibson, Mahony et al. 2015; Marocolo, Willardson et al. 2016; Valenzuela, Martin-Candilejo et al. 2021). Rzadziej napotkać można badania opisujące procedurę zdalnego hartowania przez niedokrwienie.

Pionierskie badania zdalnego hartowania przez niedokrwienie wykorzystujące model człowieka należały do Kimura, Ueda et al. (2007). Po wykonaniu procedury RIPC polegającej na okluzji jednego ramienia sześć razy dziennie przez okres 4 tygodni wykazano poprawę funkcji śródbłonna naczyniowego poprzez zwiększenie produkcji tlenu azotu (NO) oraz zwiększony poziom czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF) w osoczu krwi. Według autorów uzyskane wyniki badań mogą mieć szczególne znaczenie w chorobach układu krążenia, gdzie obserwuje się spadek funkcji naczyń krwionośnych, zwłaszcza wynikający ze wzrostu oporu naczyniowego i spadku ich elastyczności. Wyniki tej pracy mogą również przekładać się na efektywność pracy mięśni w wysiłkach submaksymalnych podczas, których duże znaczenie pełnią naczynia krwionośne. Odmienne podejście do modelu zdalnego hartowania przez niedokrwienie przedstawione zostało w pracy Foster, Westerdahl et al. (2011). Wykonywali oni procedurę RIPC na jednym udzie przez okres 5 dni, co spowodowało wzrost wysycenia krwi tlenem na wysokości 4342 n.p.m oraz spadek ciśnienia skurczowego w tętnicach płucnych. Tak zaprezentowany model badawczy oraz uzyskane wyniki mogą sugerować potencjalne korzyści sportowe przy zastosowaniu procedury IPC zwłaszcza w przypadku wytrzymałościowych sportów górskich (biegi górskie, biathlon, etc.).

Biorąc pod uwagę możliwości wysiłkowe organizmu, który podlega złożonej i wieloelementowej regulacji, niezmiennym jest fakt, iż metabolizm oksydacyjny wykonujących pracę mięśni nadal pozostaje ich głównym wyznacznikiem. Dotychczasowe prace naukowe wykazały, że mięśnie poddane epizodom IPC mogą przyczyniać się do

rozszerzenia naczyń tętniczych i tym samym wzrostu przepływu krwi w naczyniach i tkankach (Enko, Nakamura et al. 2011). Ponad to skutek procedury IPC dochodzi do zwiększenia zdolności oksydacyjnych mięśni szkieletowych poprzez dotlenienie mikronaczyniowe (Jeffries, Waldron et al. 2018) oraz obniżenia dynamiki procesów uszkodzeń oksydacyjnych innych tkanek podczas wtórnych epizodów niedokrwienia (Koti, Seifalian et al. 2002; Mallick, Yang et al. 2005). Udowodniono, że mechanizmy odpowiedzialne za powstawanie zmian pod wpływem zastosowania procedury IPC, oprócz skuteczniejszego wykorzystania tlenu przez tkanki, mogą przyspieszyć przemiany metaboliczne w przeciwdziałaniu wyczerpania źródeł energetycznych, w tym glikogenu (Pang, Yang et al. 1995; Schroeder, Lee et al. 1996; Addison, Neligan et al. 2003). W konsekwencji oddziaływanie ischemii rozwija szereg mechanizmów ochronnych przeciwdziałających czynnikom stresogennym, takim jak powtarzające się epizody niedokrwienia. Dlatego też protekcyjny efekt IPC wydaje się być wielokierunkowy, a charakter tej metody oddziaływania na ciało ludzkie nie ogranicza się jedynie do efektu metabolicznego i przeciwdziałającego efektom wtórnego niedokrwienia, a staje się punktem rozważań wdrożeniowych w zakresie odnowy biologicznej, fizjoterapii, aktywności fizycznej czy też rywalizacji sportowej (Incognito, Burr et al. 2016).

Mimo dotychczasowych osiągnięć naukowych, nadal nie zostały w pełni poznane mechanizmy przystosowawcze poddanych zdalnemu hartowaniu przez niedokrwienie tkanek oraz związanych z nimi zmiennością markerów biochemicznych. Ponad to większość badań oparta jest na zastosowaniu tylko jednorazowej procedury RIPC. Ciekawe wydaje się, że niewiele wiadomo o wpływie wielokrotnego powtarzania procedury zdalnego hartowania przez niedokrwienie. Poznanie procesu związanego z wydzielaniem przez mięśnie szkieletowe cytokin do krwi obwodowej po zastosowaniu jednorazowej i dziesięciodniowej procedury zdalnego hartowania przez niedokrwienie może przyczynić się do szerszego wykorzystania RIPC jako metody zwiększania możliwości wysiłkowych organizmu, jak również zapobiegania uszkodzenia tkanek indukowanych maksymalnym wysiłkiem fizycznym. Wynika to z faktu, iż mięsień szkieletowy jest zdolny do syntezy i uwalniania szeregu białek, cytokin i związków niskocząsteczkowych w zależności od wielkości wysiłku fizycznego, intensywności, czasu trwania, jak również sprawności fizycznej (Brandt and Pedersen 2010; Pedersen 2011). W związku z powyższym, przypuszcza się, że przerywane epizody niedokrwienne będą prowadziły do uwalniania czynników zwiększających odporność mięśni i tkanek na uszkodzenie wskutek wysiłku fizycznego, a co za tym idzie zwiększenie możliwości wysiłkowych organizmu (Zhou, Zeng et al. 2010; Pedersen and Febbraio 2012).

W sytuacjach treningowych, w których wskazana jest ochrona mięśni szkieletowych, głębsze zrozumienie mechanizmów sygnalizacji komórkowej wynikającej z zastosowania jednorazowej i dziesięciodniowej procedury RPC może stanowić cenny punkt wyjścia do dalszych badań, związanych z rozwojem przystosowania molekularnych mechanizmów w obszarze zdalnie hartowanych przez niedokrwienie tkanek i narządów zaangażowanych do wysiłku anaerobowego.

I PROBLEM BADAWCZY W LITERATURZE

1.1. Wpływ hartowania przez niedokrwienie na funkcje i możliwości wysiłkowe organizmu

Ostatnie badania poświęcone problematyce hartowania przez niedokrwienie wykazały, że powtarzające się epizody niedokrwienia, a następnie reperfuzji, mogą przyczynić się do zmian przystosowawczych w obrębie określonych grup mięśniowych, co może umożliwić poprawę lokalnych możliwości wysiłkowych, jak również całego organizmu (Crisafulli, Tangianu et al. 2011; Bailey, Jones et al. 2012; Mieszkowski, Stankiewicz et al. 2020; Mieszkowski, Stankiewicz et al. 2021). Jak wspomniano wcześniej, procedura IPC została początkowo opracowana w celu zmniejszenia uszkodzeń narządów wewnętrznych spowodowanych niedokrwieniem i reperfuzją (Murry, Jennings et al. 1986). Coraz więcej dyskusji toczy się wokół zastosowania hartowania przez niedokrwienie w kształtowaniu efektywności wykonywanych ćwiczeń, poprzez poprawę dotlenienia mięśni, naczyń krwionośnych i dopływu krwi do aktywnych tkanek i narządów (Caru, Levesque et al. 2019). Udowodniono, że wywołanie stanu przejściowego zamknięcia tętnic w obszarze kończyn górnych lub dolnych przed wykonaniem ćwiczeń fizycznych może wpływać na poprawę ich wykonania, co może przekładać się na uzyskanie lepszego wyniku sportowego (de Groot, Thijssen et al. 2010; Jean-St-Michel, Manlhiot et al. 2011; Kido, Suga et al. 2015; Patterson, Bezodis et al. 2015).

Liauw, Rubin et al. (1996) wykazali, że mięsień szkieletowy może być chroniony przed uszkodzeniem niedokrwienno-reperfuzyjnym poprzez wstępne przygotowanie przeciwległego mięśnia szkieletowego za pomocą procedury RIPC. Analiza nukleotydów adeninowych w tkankach mięśniowych wykazała, że dzięki procedurze RIPC doszło do mniejszego spadku adenosynotrójfosforanu (ATP) oraz zaobserwowano redukcję martwicy mięśnia o 60% (Liauw, Rubin et al. 1996). Podobny rezultat zaobserwował A. Bushell, Klenerman et al. (2002) wykorzystując szczurzy model niedokrwienia jednej kończyny. Wyniki przeprowadzonego eksperymentu wykazały ochronę mięśnia piszczelowego przedniego przed uszkodzeniem strukturalnym po 4 godzinnym okresie niedokrwienia i 1 godzinnym okresie reperfuzji.

Choć nie wszystkie publikacje są zgodne z Billah, Ridiandries et al. (2019) i Valenzuela, Martin-Candilejo et al. (2021) warto wspomnieć, że stosowanie w treningu

fizycznym zjawiska ograniczenia przepływu krwi (BFR- z ang. *blood flow restriction*) zarówno w monoterapii, jak i w połączeniu z treningiem o niskiej intensywności, może przyczynić się do poprawy poziomu siły mięśniowej (Burgomaster, Moore et al. 2003) oraz objętości włókien mięśniowych (Takarada, Sato et al. 2002; Laurentino, Ugrinowitsch et al. 2008). Interesującym jest fakt, że część autorów zaobserwowała istotny wpływ IPC i RIPC na trening oporowy da Silva Novaes, da Silva Telles et al. (2020) w swoich badaniach dowiedli, że wykonanie procedury IPC przed treningiem zwiększyło ilości powtórzeń w każdej serii ćwiczeń siłowych. W konsekwencji wykonanego eksperymentu całkowita objętość (suma całkowitej liczby powtórzeń $\times$ obciążenie dla każdego ćwiczenia) wszystkich ćwiczeń była znacznie większa w grupie poddanej IPC na poziomie zacisku 220 mmHg obu tętnic ramieniowych (46170 kg) niż w grupie wykonującej IPC na poziomie zacisku 20 mmHg (36590 kg) i grupą kontrolną (34069 kg). Podobne rezultaty zaobserwował L. Carvalho and Barroso (2019) badając wpływ IPC na liczbę powtórzeń próby jednostronnego wyprostu kolana dominującej nogi przy obciążeniu o wartości 85% maksymalnych możliwości badanych. Uczestnicy z grupy, w której przeprowadzono naprzemiennie procedurę hartowania przez niedokrwienie obu kończyn dolnych (zacisk na poziomie 250 mmHg), wykonali średnio 20% więcej powtórzeń, w porównaniu z grupą placebo (zacisk na poziomie 10 mmHg). Podczas tego badania zarejestrowano także aktywność elektryczną mięśni za pomocą elektromiografii powierzchniowej (EMG). Nie stwierdzono jednak istotnych statystycznie różnic między badanymi grupami dla mediany częstotliwości widma mocy oraz średniej amplitudy sygnału EMG (Carvalho and Barroso 2019). Podobne badanie wykonali Niespodzinski, Mieszkowski et al. (2021), poddając analizie także próbę jednostronnego wyprostu kolana dominującej nogi. Tym razem procedurę RIPC powtarzano przez 10 kolejnych dni, wykonując zacisk na kończynie niedominującej na poziomie 220 mmHg w grupie RIPC oraz 20 mmHg w grupie kontrolnej. Eksperyment ten wykazał, że 10 dniowe zdalne hartowanie przez niedokrwienie wywołało istotnie niższe wartości mediany częstotliwości widma mocy sygnału EMG podczas próby zmęczenia mięśni prostujących staw kolanowy oraz zwiększyło szybkość rozwijanego momentu siły mięśnia czworogłowego uda.

Z drugiej strony, część autorów nie zaobserwowała jednoznacznej poprawy możliwości siłowych pod wpływem hartowania przez niedokrwienie. W badaniu Marocolo, Marocolo et al. (2016) liczba powtórzeń czynności zginania ramienia w stawie łokciowym z wykorzystaniem ukośnej ławeczki Scott Biceps Curl wzrosła dla wszystkich osób poddanych eksperymentowi. Zastanawiający jest fakt, iż hartowanie przez niedokrwienie

wykonane w obrębie ramion zwiększyło liczbę powtórzeń zarówno dla grupy poddanej hartowaniu przez niedokrwienie z uciskiem ramion na poziomie 220 mmHg, jak również i dla grupy placebo z zaciskiem ramion na poziomie 20 mmHg. Ten sam rezultat uzyskano po hartowaniu obu kończyn dolnych według tego samego protokołu (Marocolo, Marocolo et al. 2016). W kolejnym badaniu tego samego autora oceniono wpływ naprzemiennego niedokrwienia obu kończyn dolnych na liczbę powtórzeń wyprostów nóg z oporem w trzech seriach ćwiczeń. Wyniki poddanych eksperymentowi trzynastu mężczyzn ponownie wykazały, że w grupie IPC (zacisk sfigmomanometru na poziomie 220 mmHg) i grupie placebo (zacisk sfigmomanometru na poziomie 20 mmHg) nastąpiła poprawa w liczbie powtórzeń wyprostu nóg oraz całkowitej objętości ćwiczeń (liczbę powtórzeń $\times$ obciążenie). z kolei Valenzuela, Martin-Candilejo et al. (2021), analizując wpływ jednorazowej procedury hartowania przez niedokrwienie obu ramion 40 min przed wyciskaniem sztangi określonego ciężaru w pozycji leżącej na ławeczce (obciążenia zostały dobrane 30, 50 i 70% do masy ciała) nie stwierdzili poprawy możliwości siłowych ramion i klatki piersiowej. W dalszych poszukiwaniach mechanizmów poprawy możliwości siłowych człowieka na skutek procedury IPC przeprowadzono badanie hemodynamiki mięśni i wychwytu tlenu podczas powtarzanych maksymalnych skurczów. W krzyżowym, randomizowanym badaniu z pojedynczą ślepą próbą, dziesięciu wytrenowanych mężczyzn, wykonało pięć serii pięciokrotnego wyprostu stawu kolanowego prawej nogi w warunkach pracy izokinetycznej. W pierwszej grupie zadany wysiłek wykonano po jednorazowej procedurze IPC prawej kończyny dolnej przy zacisku 200 mmHg, natomiast w drugiej grupie przeprowadzono pozorowany ucisk kończyny dolnej na poziomie 20 mmHg. W porównaniu z grupą placebo u osób wykonujących procedurę hartowania przez niedokrwienie przy zacisku nogi na poziomie 200 mmHg zaobserwowano zwiększenie objętość krwi mięśniowej w spoczynku o 46,5%. z kolei podczas badania możliwości siłowych zanotowano poprawę szczytowego momentu siły o 11,8% oraz średniego poboru tlenu o 15,8% (Paradis-Deschenes, Joannis et al. 2016).

Przytoczone powyżej badania, mimo różnych efektów, mogą stanowić wartość implikacyjną w treningu oporowym w zakresie zwiększania maksymalnego potencjału siły mięśniowej i powtarzalności czynności ruchowych podczas jednostki treningowej. Biorąc pod uwagę możliwości zwiększenia wysycenia tlenem krwi tętniczej oraz przepływu krwi w naczyniach krwionośnych po zastosowaniu procedury hartowania przez niedokrwienie, przeprowadzono liczne badania nad wykorzystaniem metody IPC w wysiłkach o charakterze tlenowym (Enko, Nakamura et al. 2011). Istotny wpływ procedury krótkiego, całkowitego zamknięcia tętnic udowych obu kończyn dolnych na maksymalną wydolność tlenową

trenujących rowerzystów dowiedli de Groot, Thijssen et al. (2010). Powtarzane okresy niedokrwienia istotnie wpłynęły na poprawę maksymalnego zużycia tlenu z 56,8 do 58,4 ml/min/kg oraz na maksymalną moc wyjściową z 366 do 372 W. Z drugiej strony hartowanie przez niedokrwienie nie miało wpływu na wentylację płuc, iloraz oddechowy, maksymalną częstość skurczów serca, ciśnienie krwi ani na stężenie kwasu mlekowego we krwi (de Groot, Thijssen et al. 2010). W przeprowadzonych badaniach hartowania przez niedokrwienie u biegaczy długodystansowych wykazano, że w testach biegowych na pięciokilometrowym dystansie po zastosowaniu procedury IPC na obu udach uzyskano o 34s szybsze wyniki względem grupy kontrolnej (Bailey, Jones et al. 2012). W kolejnych badaniach na szesnastu zdrowych mężczyznach poddanych hartowaniu przez niedokrwienie na obie kończyny dolne zaobserwowano w próbie do odmowy na ergometrze rowerowym poprawę czasu wysiłku o 30s. Z kolei wyniki maksymalnej mocy tlenowej oraz stężenia kwasu mlekowego we krwi pozostały na podobnym poziomie (Cheung, Slys et al. 2019). Crisafulli, Tangianu et al. (2011) także zastosowali protokół IPC na obu kończynach dolnych. Podobnie zauważyli istotnie dłuższy całkowity czas pracy oraz zwiększenie mocy maksymalnej w teście o stopniowym narastającym obciążeniu przy utrzymaniu tempa 60 obr/min na ergometrze rowerowym aż do całkowitego wyczerpania (Crisafulli, Tangianu et al. 2011). W kolejnym badaniu na osiemnastu wysoko kwalifikowanych pływakach, przeprowadzono procedurę zdalnego hartowania przez niedokrwienie jednego ramienia na poziomie zacisku 150 mmHg, przed dwoma testami pływania. W pierwszym teście, który polegał na przepłynięciu siedmiu 200-metrowych dystansów z intensywnością submaksymalną i 6 minutowymi odpoczynkiem między seriami, nie zanotowano żadnych zmian w pomiarze prędkości na wyznaczonym dystansie, częstości skurczów serca oraz stężeniu mleczanu we krwi. Natomiast w drugim teście polegającym na wykonaniu dwóch prób wysiłku maksymalnego na dystansie 100m lub 200m, po wykonanym RIPC, zanotowano o 0,70s krótszy czas przepłyniętego dystansu ($p<0.05$), co niewątpliwie może mieć istotne znaczenie dla wyniku sportowego (Jean-St-Michel, Manlhiot et al. 2011).

Coraz większa rywalizacja w sportach wytrzymałościowych zmusza sportowców do treningu na różnych wysokościach nad poziomem morza, co wiąże się z pewnymi ograniczeniami dostępności tlenu podczas wysiłku fizycznego. Hartowanie przez niedokrwienie jako nieinwazyjna technika, obejmująca powtarzające się epizody niedokrwienia mięśni, po których następuje reperfuzja w spoczynku, indukuje przejściową hipoksję obwodową i może znacząco poprawić maksymalną wydolność wysiłkową. Lepsze dostarczanie i wykorzystanie tlenu w tym procesie może również okazać się korzystne

w treningu wysokogórskim. Dowodzi tego badanie Paradis-Deschenes, Joannis et al. (2018), którego wyniki czterech prób pięciokilometrowej jazdy na ergometrze rowerowym w komorze hipoksyjnej, wykonanych na dwóch różnych wysokościach nad poziomem morza po wykonaniu IPC (3×5 min niedokrwienie przy zacisku 220 mmHg i 5min reperfuzją) istotnie poprawiły czas ukończenia prób wytrzymałościowych. W opisywanym badaniu lepsze efekty czasowe po hartowaniu obu kończyn dolnych uzyskano na wysokości 2400m niż na 1200m n.p.m. Większe możliwości wysiłkowe na poziomie 2400m były związane ze zwiększonym wysyceniem tlenem krwi tętniczej (SpO₂) oraz wskaźnikiem nasycenia tkanki mięśnia czworogłowego (Paradis-Deschenes, Joannis et al. 2018). Zastosowana procedura IPC przez pięć kolejnych dni również zwiększyła SpO₂ o 5% podczas wspinaczki górskiej z poziomu 3560 do 4342m n.p.m. (Foster, Giri et al. 2014). Z drugiej strony, jednorazowa procedura IPC nie wpłynęła na poprawę SpO₂ i możliwości wysiłkowe podczas jazdy na ergometrze rowerowym w symulowanej wysokości 3800m u rowerzystów amatorów w porównaniu z grupą kontrolną (Foster, Westerdahl et al. 2011). W badaniu Hittinger, Maher et al. (2015) także nie uzyskano poprawy możliwości wysiłkowych po jednorazowym IPC podczas testu wysiłkowego o stopniowym zwiększaniu obciążenia do odmowy na symulowanej wysokości około 3650m n.p.m. u wytrenowanych rowerzystów. Może być to przesłanką ergogenicznego wpływu IPC na reakcje fizjologiczne i możliwości wysiłku organizmu na wysokości (Foster, Westerdahl et al. 2011).

Podczas gdy w wielu pracach dostrzega się korzyści płynące z zastosowania procedury IPC w zakresie wysiłku aerobowego (Crisafulli, Tangianu et al. 2011; Bailey, Jones et al. 2012; Barbosa, Machado et al. 2015; Cruz, de Aguiar et al. 2015; Kido, Suga et al. 2015) jego wpływ na wyniki zależne od metabolizmu anaerobowego są niejednoznacznie (Salvador, De Aguiar et al. 2016). W badaniach Clevidence, Mowery et al. (2012) przeprowadzonych w grupie kolarzy wyczynowych na poziomie amatorskim wykazano brak poprawy wyników przy submaksymalnym natężeniu pracy (Cheung, Słysz et al. 2019). Podobny rezultat uzyskali Gibson, Mahony et al. (2015), badając wpływ RIPC u zawodników reprezentujących sporty zespołowe. Po przeprowadzonej jednorazowej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej na poziomie zacisku 220 mmHg wykonano 5 maksymalnych sprintów po 6s na ergometrze rowerowym z obciążeniem 7,5% masy ciała, przeplatanych 24-sekundowym odpoczynkiem. Uzyskane wyniki wykazały brak poprawy możliwości wysiłkowych wśród badanych sportowców po zastosowaniu procedury RIPC (Gibson, Mahony et al. 2015). Podobnie w przypadku badań Lalonde and Curnier (2015) na 17 młodych, aktywnych osobach, procedura zdalnego hartowania przez niedokrwienie

prawego ramienia nie zapewniła znaczących korzyści dla 30s testu Wingate (Lalonde and Curnier 2015). Co ciekawe Paixao, da Mota et al. (2014), wykonując trzykrotny 30s Wingate Test po hartowaniu obu kończyn dolnych oprócz tego, że nie zaobserwowali poprawy wyników, to zanotowali ich pogorszenie. Z drugiej strony poprawę możliwości beztlenowych po zastosowaniu IPC przed dwunastokrotnie powtórzonym sprintem trwającym 6s na ergometrze rowerowym wykazali Patterson, Bezodis et al. (2015). Zaprezentowane wyniki ujawniły wzrost szczytowej i średniej mocy na wczesnych etapach powtarzanych sprintów, co może być korzystne dla sportów szybkościowych (Patterson, Bezodis et al. 2015). W innym badaniu zastosowana procedura IPC miała istotny wpływ na skrócenie czasu przepłynięcia 100m stylem dowolnym u pływaków amatorów w porównaniu do grupy kontrolnej (Marocolo, da Mota et al. 2015).

W dostępnych pracach badawczych choć jest ich niewiele dostrzega się również procedury ukierunkowane na wskazanie opóźnionych efektów IPC. W teście wyskoku z półprzysiadu ze sztangą zaobserwowano korzystny wpływ hartowania przez niedokrwienie na siłę ekscentryczną i przyspieszenie po 24 godzinach od zakończenia IPC na obu kończynach dolnych (Beaven, Cook et al. 2012). Powyższy wynik może świadczyć o tzw. drugim oknie ochrony (z ang. *second window of protection*), które skutkuje efektem oddalonego w czasie hartowania przez niedokrwienie. Procedura ta daje zbliżone efekty do prób wysiłkowych wykonanych zaraz po zakończeniu IPC. Teorię tę wspierają badania Yamashita, Hoshida et al. (1998), w których wykazano istotny wzrost zawartości dysmutazy ponadtlenkowej manganu (Mn-SOD) w regionie niedokrwionym lewej tętnicy wieńcowej mięśnia sercowego w przypadku szczurów operowanych 24 godziny po wykonaniu hartowania przez niedokrwienie (Yamashita, Hoshida et al. 1998). W pracy autorstwa Mieszkowski, Kochanowicz et al. (2019) procedura hartowania przez niedokrwienie została użyta przez dziesięć kolejnych dni, co ze względu na powtarzalny charakter zostało opisane jako trening IPC. Skutki eksperymentu oceniono 24 godziny po 10 dniowej procedurze hartowania przez niedokrwienie kończyn górnych na podstawie jednorazowego Testu Wingate (WAnT). Ocenie, oprócz zmiennych fizjologicznych, poddano również zamiany ekspresji genów kodujących podjednostki ferrytyny. W rezultacie dziesięciodniowy trening IPC istotnie zwiększył względną moc kończyn górnych (z $5,29 \pm 0,50$ do $5,79 \pm 0,70$ (W/kg), $p < 0,05$) oraz spowodował znaczne zwiększenie ferrytyny H (FTH) i ferrytyny L (FTL) mRNA (z $2 \wedge 254,2$ do $2 \wedge 1678,6$ ($p = 0,01$) dla FTH i $2 \wedge 81,5$ do $2 \wedge 923$ ($P = 0,01$) do FTL). Ponadto zaobserwowano istotny statystycznie spadek mRNA receptora transferrytyny (TFRC). Mieszkowski, Stankiewicz et al. (2020) realizowali również badania

z zastosowaniem procedury 10 dniowej procedury hartowania przez niedokrwienie obu kończyn dolnych w populacji biegaczy dalekodystansowych. Procedura RIPC została zrealizowana 24 godziny przed biegiem na dystansie 42km. Wyniki badań wykazały istotnie niższy poziom stężenia interleukiny 6 (IL-6), folistatyny 1 (FSTL-1) i rezystyny oraz istotnie większe stężenie tkankowego inhibitora metaloproteinazy1 (TIMP-1) po biegu maratońskim u biegaczy, którzy zrealizowali dziesięciodniową procedurę hartowania przez niedokrwienie. Jest to pierwsze badanie, które wykazało korzystne działanie przeciwzapalne procedury IPC w populacji osób trenujących biegi dalekodystansowe (Mieszkowski, Stankiewicz et al. 2020).

Biorąc pod uwagę wcześniejsze badania, niniejsza praca przez wzgląd na zastosowane procedury jednorazowego i dziesięciodniowego zdalnego hartowania przez niedokrwienie ma na celu wykazanie ich wpływu na możliwości anaerobowe oraz markery biochemiczne nasilonej odpowiedzi powysiłkowej w pierwszym i drugim oknie czasowym ochrony tkanek. W przypadku wykonania testu maksymalnych możliwości anaerobowych 60min od zakończenia jednorazowej procedury zdalnego hartowania przez niedokrwienie, analizy wyników badań z założenia traktowane są przez pryzmat bezpośredniego okna czasowego ochrony tkanek poddanych wysiłkowi fizycznemu. Z kolei, testowane możliwości anaerobowe zrealizowano po 24 godzinach od zakończenia 10 dniowej procedury hartowania przez niedokrwienie, co traktowane jest jako drugie okno czasowe ochrony tkanek i narządów.

1.2. Zmiany adaptacyjne indukowane przez wysiłek fizyczny- rola miokina.

Wysiłek fizyczny jest bodźcem, który za sprawą aktywności poszczególnych mięśni wytrąca organizm z homeostazy i zaburza wewnętrzne procesy metaboliczne. Pod koniec XX wieku mięśnie szkieletowe zostały zidentyfikowane jako narząd wydzielniczy. Udowodniono, że pracujący mięsień poprzecznie prążkowany reguluje metaboliczną i fizjologiczną odpowiedź w innych narządach (Pedersen and Febbraio 2012). Mięśnie szkieletowe są największym organem stanowiącym ok. 40% masy ciała u zdrowych ludzi. Jako narząd endokrynnny wydziela szereg cytokin i białek zwanych miokinami, syntetyzowanych i wydzielanych przez miocyty w odpowiedzi na skurcz mięśni. Miokiny pełnią funkcję autokrynną w regulacji metabolizmu mięśni, a także endokrynną funkcję regulacyjną w odległych narządach i tkankach, takich jak kości, tkanka tłuszczowa, mózg i wątroba (Gomarasca, Banfi et al. 2020). Związek między cytokinami, a mięśniami szkieletowymi

został ustalony po raz pierwszy, kiedy naukowcy odkryli, że endogenny pirogen był obecny w mięśniach szkieletowych (Snell and Atkins 1965; Peake, Della Gatta et al. 2015). Innego ważnego odkrycia dokonali Cannon and Kluger (1983) udowadniając, że ćwiczenia wytrzymałościowe pobudzają system uwolnienia pirogenego związku. Od tego czasu nastąpiło duże zainteresowanie znaczeniem biologicznym i regulacją produkcji cytokin w mięśniach indukowanych wysiłkiem fizycznym. Początkowo badania związków cytokin z wysiłkiem fizycznym koncentrowały się na reakcjach zapalnych wynikających z uszkodzenia mięśni po wysiłku. Jednak badania zgromadzone w ciągu ostatniej dekady świadczą, że cytokiny odgrywają znacznie szerszą rolę w aktywności fizycznej niż zakładano na początku, przyczyniając się do zmniejszenia stanu zapalnego, co ma przełożenie na możliwości wysiłkowe organizmu ludzkiego (Mieszkowski, Stankiewicz et al. 2020). Innym ważnym efektem działania miokiny jest także regulacja homeostazy energetycznej poprzez regulację metabolizmu glukozy i lipidów. Miokiny wpływają również na hipertrofię włókien mięśniowych i ich regenerację oraz pobudzają tworzenie się nowych naczyń włosowatych (angiogenezę). Ze względu na pleiotropowe działanie, stanowią perspektywny cel terapeutyczny w leczeniu regeneracji mięśni, otyłości i neurobiologii (Stranska and Svacina 2015). W ostatnim czasie znaczną uwagę poświęcono modulacji produkcji cytokin i wpływowi regularnych ćwiczeń w przeciwdziałaniu chorobom. Co ważne, wydzielana miokina wywołana wysiłkiem fizycznym może wywierać działanie przeciwzapalne. Proces ten przeciwdziała nie tylko ostremu zapaleniu spowodowanemu infekcją, ale także przewlekłemu stanowi zapalnemu o niskim stopniu nasilenia, powstałemu w wyniku braku aktywności fizycznej, starzenia się lub zaburzeń metabolicznych (tj. otyłość, cukrzyca typu 2) (Gomarasca, Banfi et al. 2020). Najczęściej po wykonanych ćwiczeniach fizycznych obserwuje się wzrost stężenia poszczególnych cytokin w krwioobiegu. Ekspresja genów dla niektórych cytokin również zwiększa się w mięśniach szkieletowych. Wydaje się jednak, że istnieje zależność między lokalną ekspresją genów w mięśniach szkieletowych, a ogólnoustrojowym stężeniem wybranych cytokin (Peake, Della Gatta et al. 2015). Większość cytokin to indukowalne mediatory, które są transportowane przez krążenie ogólnoustrojowe i zostają szybko syntetyzowane przez wiele typów komórek w odpowiedzi na różne bodźce. Poszczególne typy komórek mogą wyrażać i wydelać kilka cytokin jednocześnie w odpowiedzi na pojedynczy bodziec np.: wysiłek fizyczny (Peake, Della Gatta et al. 2015).

Mięsień szkieletowy składa się z wielu różnych typów komórek, takich jak fibroblasty, neutrofile, komórki szpikowe, perycyty, które również są zdolne do syntezy

cytokiny (Tiku, Tiku et al. 1986; Le, Weinstein et al. 1987; Pue, Mortensen et al. 1996; De Rossi, Bernasconi et al. 2000). W odpowiedzi na uraz mięśni fibroblasty namnażają się i zaczynają produkować bogate w kolagen macierzy zewnątrzkomórkową przywracającą szkielet mięśnia (Li and Huard 2002). Neutrofile odgrywają ważną rolę w rozkładzie uszkodzonej tkanki mięśniowej w ostrej fazie urazu mięśni, podczas gdy monocyty i makrofagi regulują późniejszą regenerację tkanek (Tiku, Tiku et al. 1986). Jako komórki wytwarzające cytokiny, komórki śródbłona, perycyty, fibroblasty, neutrofile, monocyty i makrofagi mogą przyczyniać się do globalnej ekspresji cytokin w mięśniach szkieletowych (Peake, Della Gatta et al. 2015). Do tej pory zidentyfikowano następujące miokiny m.in. interleukina 4 (IL4), IL6, interleukina 10 (IL10), interleukina 15 (IL15), miostatyna, czynnik hamujący białaczkę (LIF), neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego (BDNF), insulinopodobny czynnik wzrostu (IGF1), czynnik wzrostu fibroblastów 2 (FGF2), białko związane z folistatyną 1 (FSTL1), iryzyna, erytropoetyna (EPO) i kwas β -aminoizomasłowy (BAIBA).

Jedną z najlepiej przebadanych miokin jest Interleukina 6. Po raz pierwszy IL-6 została odkryta i nazwana interferonem (IFN) w 1980 roku przez Weissenbacha i wsp. podczas próby sklonowania i scharakteryzowania genu IFN w ludzkich fibroblastach (Weissenbach, Chernajovsky et al. 1980). Następnie zmieniono jej nazwę na czynnik stymulujący limfocyty B-2 (Akira and Takeda 2004), potem na czynnik różnicowania limfocytów B, czynnik zastępującym limfocyty T, białkiem 26 kDa (Content, De Wit et al. 1982), czynnik wzrostu hybrydomy (Van Snick, Cayphas et al. 1986), czynnik plazmocytomy interleukin 1, czynnik wzrostu plazmocytomy (Nordan, Pumphrey et al. 1987), czynnik stymulujący hepatocyty (Gauldie, Richards et al. 1987), czynnik indukujący granulocyty makrofagów 2, cytotoksyczny czynnik różnicowania limfocytów T (Takai, Wong et al. 1988) i trombopoietyną ze względu na swoje funkcje biologiczne (Content, De Wit et al. 1982; Van Snick, Cayphas et al. 1986; Gauldie, Richards et al. 1987; Nordan, Pumphrey et al. 1987; Takai, Wong et al. 1988; Akira and Takeda 2004). W 1989 roku, kiedy stwierdzono, że te różnie nazwane białka są identyczne na podstawie ich sekwencji aminokwasów i nukleotydów, ujednolicono nazewnictwo na Interleukiny-6 (Song and Kellum 2005; Pedersen and Febbraio 2008). IL-6 należy do grupy cytokin znanych jako „rodzina IL-6”, „cytokina typu długiego I” lub „cytokina gp130”. Oprócz IL-6 w skład tej grupy wchodzi: rzęskowy czynnik neurotroficzny (CNTF), IL-11, czynnik hamujący białaczkę (LIF), onkostatyna M (OSM), kardiotrofina 1 (CT-1) i cytokina kardiotrofinopodobna (CLC) (Pedersen and Febbraio 2008). Cytokiny z rodziny IL-6 wykazują nakładające się, ale także

odrębne działania biologiczne i biorą udział m.in. w regulacji wątroby, w stymulacji limfocytów B, w regulacji równowagi pomiędzy regulatorowymi i efektorowymi limfocytami T, w regulacji metabolicznej i w wielu funkcjach neuronowych. Wykazano także, że blokada cytokin z rodziny IL-6 jest korzystna w chorobach autoimmunologicznych (Rose-John 2018). Wiadomo jest, że głównym źródłem IL-6 są komórki mięśniowe, które w odpowiedzi na skurcz mięśni wydzielają ją do krwioobiegu (Pedersen, Steensberg et al. 2001; Pedersen and Febbraio 2012). Jej poziom wzrasta wykładniczo w stosunku do czasu wykonywania ćwiczeń oraz ilości włókien mięśniowych zaangażowanych w ćwiczenie (Pedersen and Febbraio 2008). Warto zauważyć, że szczytowy poziom IL-6 osiągany jest najczęściej pod koniec ćwiczenia lub krótko po nim, po czym następuje gwałtowny spadek do poziomu sprzed ćwiczeń (Ostrowski, Hermann et al. 1998). Ogólnie rzecz biorąc, połączenie trybu, intensywności i czasu trwania ćwiczenia determinuje wielkość wywołanego wysiłkiem wzrostu poziomu IL-6 w osoczu (Peake, Della Gatta et al. 2015). Ponadto udowodniono, że wskaźnik transkrypcji zwiększa się dla poziomów mRNA IL-6 wyraźnie w ciągu 30min od rozpoczęcia ćwiczeń (Pedersen and Febbraio 2012). Wynika z tego, że czynnik związany ze skurczami mięśni jest zaangażowany w regulację transkrypcji IL-6 w jądrach komórek mięśniowych.

Należy nadmienić, że ekspresja mRNA i uwalnianie białka IL-6 są znacznie zwiększone w sytuacji obniżonego stężenia glikogenu, co sugeruje, że IL-6 działa jako sensor energii. Liczne badania wykazują, że spożycie glukozy podczas wysiłku osłabia wywołany pracą mięśni wzrost poziomu IL-6 w osoczu i hamuje uwalnianie IL-6 z kurczących się mięśni szkieletowych u ludzi (Pedersen, Steensberg et al. 2001). Ponadto mięśnie szkieletowe to tkanki, które mogą zmieniać rodzaj i ilość białka w odpowiedzi na regularne ćwiczenia fizyczne. W konsekwencji następuje proces adaptacji mięśni szkieletowych indukowany wysiłkiem fizycznym, co skutkuje obniżeniem poziomu spoczynkowego IL-6 w osoczu. Jak wskazują badania, największy wpływ na tę zmianę ma trening wytrzymałościowy (Neubauer, Sabapathy et al. 2014). Co ciekawe, poprzez wysiłek tlenowy spoczynkowe stężenie IL-6 w osoczu obniża się, ale ekspresja w mięśniach receptora Interleukiny 6 alfa (IL-6R α) ulega zwiększeniu. w odpowiedzi na trening wytrzymałościowy zawartość mRNA IL6R α w mięśniach wzrasta o ~ 100%. z drugiej strony wysoki poziom IL-6 w osoczu jest skorelowany z brakiem aktywności fizycznej, ponieważ nieużywanie mięśni prowadzi do oporności na IL-6 jaką stanowi podobieństwo do insulino-oporności (Pedersen and Febbraio 2012).

W związku z tym początkowo IL-6 została sklasyfikowana jako cytokina prozapalna, głównie ze względu na jej wzrost we wczesnym przebiegu infekcji oraz wysokim stężeniu u osób starszych, otyłych i chorych na cukrzycę typu II. Jednak po głębszej analizie zweryfikowano przyjęty pogląd i zaklasyfikowano IL-6 jako cytokinę przeciwzapalną wyjaśniając, że podwyższony poziom IL-6 w osoczu stwierdzany u tych osób jest raczej wywołany stanem zapalnym niż jego przyczyną (Tilg, Dinarello et al. 1997; Steensberg, Fischer et al. 2003). Ponadto przeciwzapalne działanie IL-6 jest również wykazane poprzez stymulację organizmu do produkcji klasycznych cytokin przeciwzapalnych takich jak IL-1 i IL-10 (Snell and Atkins 1965; Pedersen and Febbraio 2012).

Kolejnymi cytokinami z rodziny interleukin-6 to grupa neuropoetyn składająca się z IL-11, rzęskowego czynnika neurotroficznego, czynnika hamującego białaczkę, onkostatyny M, kardiotrofiny 1, cytokiny podobnej do kardiotrofiny oraz IL-27. Są one zgrupowane w jednej rodzinie, ponieważ kompleks receptorowy każdej z tych cytokin zawiera dwie lub jedną cząsteczkę podjednostki receptora sygnałowego gp130 (Heinrich, Behrmann et al. 1998). Cytokiny z rodziny IL-6 wykazują nakładające się, ale także odrębne działania biologiczne i biorą udział m.in. w regulacji ostrej fazy reakcji wątroby, w stymulacji limfocytów B, w regulacji równowagi pomiędzy regulatorowymi i efektorowymi limfocytami T, w regulacji metabolicznej i w wielu funkcjach neuronowych (Rose-John 2018). Jedną z szeroko opisanych neuropoetyn jest czynnik hamujący białaczkę, który został zidentyfikowany w 1988 roku jako białko wydzielane przez komórki nowotworowe wodobrzusza (Hilton, Nicola et al. 1988). Jego nazwa pochodzi od zdolności do indukowania, różnicowania komórek białaczki szpikowej, a tym samym do zapobiegania wzrostowi komórek białaczkowych (Finkelstein, Bartlett et al. 1996; Liu, Yu et al. 2015). Czynnik hamujący białaczkę jest najbardziej plejotropowym członkiem rodziny cytokin interleukin 6 (Nicola and Babon 2015). LIF ma bardzo szeroki zakres działań w prawie wszystkich układach, w tym w układzie krwiotwórczym, kostnym, nerwowym, mięśniowym, hormonalnym i rozrodczym. Receptory LIF znajdują się w wielu różnych narządach, np. w wątrobie, kościach, macicy, nerkach i ośrodkowym układzie nerwowym (Metcalf 2003; Nicola and Babon 2015). Wykazano, że LIF jako cytokina pełni wiele ważnych funkcji. Może być wytwarzany lokalnie w mikro środowisku kości i stawów, aby odgrywać kluczową rolę w prawidłowej przebudowie i wzroście kości poprzez stymulowanie różnicowania osteoblastów i tworzenia kości. LIF odgrywa również ważną rolę w różnych aspektach rozwoju neuronalnym jak określanie fenotypu, przeżywalności i regulacji dojrzewania podczas poporodowego rozwoju neuronalnego (Liu, Yu et al. 2015). Dowody wskazują, że

LIF reguluje funkcję samoodnawiania embrionalnych komórek macierzystych i hamuje ich różnicowanie, zachowując w ten sposób ich pluripotencję. Ponadto LIF odgrywa kluczową rolę na wielu etapach podczas implantacji zarodka i jego zagnieżdżenia (Liu, Yu et al. 2015). Wykazano również, że LIF wywiera wpływ na mięsień sercowy, w tym stymuluje przeżycie i wzrost miocytów komór serca u noworodków myszy (Liu, Yu et al. 2015). Ekspresję LIF odnotowano w wielu guzach m.in. rakach piersi, skóry, jelita grubego i jamy nosowo-gardłowej (Liu, Yu et al. 2015). Stężenie LIF wzrasta także podczas zapalenia obwodowego, co ma na celu działanie przeciwzapalne (Liu, Yu et al. 2015). Czynnikiem hamującym białaczkę jest cytokina wydzielana także przez mięśnie szkieletowe na skutek skurczów włókien mięśniowych (Broholm, Laye et al. 2011). Oprócz tego LIF indukuje proliferację komórek satelitarnych, co jest uważane za niezbędne do prawidłowego przerostu mięśni i ich regeneracji (Broholm and Pedersen 2010; Broholm, Laye et al. 2011). Dowodem tego są badania Finkelstein, Bartlett et al. (1996), którzy wykazali, że LIF w odnerwionych mięśniach zmniejsza ich zanik i może stymulować ponowne ich unerwienie u badanych szczurów. Wyniki te pokazują, że LIF łagodzi atrofię mięśni wywołaną odnerwieniem i poprawia regenerację mięśni i nerwów (Finkelstein, Bartlett et al. 1996). Tak więc, jeśli chodzi o układ nerwowo-mięśniowy, główną funkcją LIF w mięśniach może być odpowiedź na uraz lub obciążenie mięśni przez wysiłek fizyczny (Nicola and Babon 2015). W innym badaniu, korzystając z modelu zmiażdżenia mięśni, wykazano, że regeneracja włókien mięśniowych u myszy pozbawionych genu LIF jest znacznie zmniejszona w porównaniu z grupą kontrolną z tego samego miotu. Ponadto wlew LIF zarówno u zwierząt z grupy kontrolnej, jak i zwierząt z nokautem LIF, stymulował regenerację mięśni, ale obserwowana stymulacja była znacznie większa u zmutowanych zwierząt niż u zwierząt kontrolnych. Odkrycia te pokazują ponownie, że LIF bierze udział w regeneracji uszkodzonych mięśni i wskazują na zastosowanie LIF jako środka terapeutycznego w leczeniu chorób nerwowo-mięśniowych (Kurek, Bower et al. 1997). W opublikowanych badaniach z 2018 roku wykazano wpływ treningu interwałowego na zwiększoną ekspresję LIF, aktywowanego przetwornika sygnału i aktywatora transkrypcji (STAT3). Ponadto stwierdzono istotną ujemną korelację między zanikiem mięśni szkieletowych a ekspresją LIF, która była stymulowana przez trening interwałowy u szczurów po wywołanym zawale (Jia, Cai et al. 2018). Co ciekawe, w innych badaniach, ćwiczenia oporowe wywołały dziewięciokrotny wzrost zawartości mRNA LIF w mięśniach szkieletowych, natomiast w tym samym badaniu LIF nie został wykryty w osoczu badanych. Jednocześnie stymulowane elektrycznie, hodowane ludzkie formy włókien mięśniowych (miotuby) wytwarzały i wydelały LIF, co sugeruje, że LIF

prawdopodobnie może być miokina o działaniu lokalnym (Broholm, Laye et al. 2011). Wyniki prac wskazują jednoznacznie, że LIF wpływa na mięśnie szkieletowe *in vivo*, jak również izolowane *in vitro* hodowle komórek mięśniowych. w związku z opublikowanymi wynikami wnioskuje się, że poziomy mRNA tego białka wydają się reagować na różne rodzaje ćwiczeń fizycznych (Barbalho, Prado Neto et al. 2020).

Drugą cytokiną należącą do rodziny IL-6, mającą wspólną podjednostkę receptora sygnałowego w postaci receptora beta OSM (OSMR β), jest onkostatyna M (Hermanns 2015). w 1989 roku Malik i wsp. opisali OSM jako polipeptyd o masie około 28 000Mr, który działa jako regulator wzrostu wielu hodowli komórkowych ssaków (Malik, Kallestad et al. 1989). Obecnie wiadomo, że onkostatyna M uwalniana jest przez monocyty i makrofagi, komórki dendrytyczne, limfocyty T oraz mięśnie w stanach zapalnych. Po związaniu się z odpowiednimi kompleksami receptorów OSM przekazuje sygnał głównie poprzez szlak JAK/STAT (Wahl and Wallace 2001; Hermanns 2015). Onkostatyna M jest strukturalnie i funkcjonalnie związana z IL6, czynnikiem hamującym białaczkę i IL11, białkami, które również wpływają na odpowiedź immunologiczną i zapalną organizmu. Zdolność OSM do zwiększania produkcji IL6 jest zgodna z rolą naprawczą tkanek tego białka. Synergistyczne oddziaływanie OSM na zwiększoną ekspresję IL6 wynika ze wzmożonej aktywności onkostatyny M w obecności prozapalnej cytokiny w miejscach urazów i zapalenia. Odkrycia *in vivo* sugerują, że OSM uczestniczy w osłabianiu odpowiedzi zapalnej i przywracaniu homeostazy po uszkodzeniu tkanki lub infekcji (Wallace, MacMaster et al. 1999; Wahl and Wallace 2001). Liczne badania wykazały także zależność OSM *in vitro* na różnicowanie megakariocytów, hamowanie wzrostu komórek guza, indukcji peptydów neurotroficznych, regulacji metabolizmu cholesterolu i wpływ na komórki pochodzące z kości (Wahl and Wallace 2001). Ponad to antyproliferacyjna rola OSM została udokumentowana w wielu publikacjach *in vitro*. Wykazano, że OSM hamuje proliferację linii komórek nowotworowych pochodzących z różnych tkanek, w tym oponiaka jajnika, płuc, ludzkiego oponiaka mózgowego, komórek nabłonka sutka, komórki czerniaka oraz raka piersi (Grant and Begley 1999; Hutt and DeWille 2002; Hojman, Dethlefsen et al. 2011). Mechanistyczne podstawy ochronny organizmu przed chorobami nowotworowymi w dużym stopniu są związane ze wzrostem stężenia OSM w surowicy oraz regulacją genu OSM po wysiłku fizycznym. Jak powszechnie wiadomo ćwiczenia fizyczne zmniejszają częstość występowania nowotworów, a także poprawiają przeżycie u pacjentów nowotworowych (Molanouri Shamsi, Chekachak et al. 2019). Dowodem na to jest praca badawcza Pernille Hojman i wsp. ukazująca znamienny wpływ onkostatyny M jako miokiny, której stężenie w surowicy rośnie od razu po wysiłku

fizycznym. W opisywanym badaniu wzrost stężenia OSM w surowicy był równoległy ze wzrostem ekspresji mięśniowej OSM w trzech badanych mięśniach. Oznacza to, że tkanka mięśniowa jest źródłem OSM podczas ćwiczeń fizycznych, co przyczynia się do hamowania proliferacji komórek MCF-7 i indukowania ich apoptozy (Hojman, Dethlefsen et al. 2011).

Następną miokina, która znajduje się w kręgu niniejszego opracowania, jest interleukina 10. Odkryta po raz pierwszy w 1989 roku jako czynnik hamujący syntezę cytokin (CSIF) przez Fiorentino, Bond et al. (1989). Została określona wówczas jako aktywność wytwarzana przez mysie komórki Th2, która hamowała aktywację i produkcję cytokin przez komórki Th1. Obecnie wiadomo, że hamowanie dotyczy aktywacji i funkcji efektorowej limfocytów T, monocytów i makrofagów, które mogą odgrywać znaczącą rolę w kontrolowaniu odpowiedzi immunologicznych. Interleukina 10 moduluje ekspresję cytokin, rozpuszczalnych mediatorów i cząsteczek powierzchniowych komórek przez komórki pochodzenia szpikowego, co ma istotne konsekwencje dla ich zdolności do aktywacji odpowiedzi immunologicznej i zapalnej (Cush, Splawski et al. 1995). Zatem uważa się, że podstawową funkcją IL-10 jest przeciwdziałanie odpowiedzi zapalnej. Świadczyły o tym badania analizujące zapalenia jelit i inne nasilone stany zapalne wykazane u myszy z niedoborem IL-10 (Kuhn, Lohler et al. 1993). Niski poziom IL-6, IL-8 i IL-1 β u pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów poddawanych terapii IL-10 również wskazuje istotny wpływ cytokiny na stan zapalny spowodowany chorobą (Cush, Splawski et al. 1995). Ponadto hamujący wpływ IL-10 na IL-1 i produkcję czynnika martwicy nowotworów (TNF) ma kluczowe znaczenie dla jego działania przeciwzapalnego, ponieważ cytokiny te często działają synergistycznie na szlakach i procesach zapalnych. Stymulacja receptorów IL-10 reguluje liczne szlaki sygnalizacji życia lub śmierci ostatecznie wpływając na przeżycie komórek poprzez hamowanie szlaków apoptotycznych (Strle, Zhou et al. 2001). A zatem, IL-10 hamuje ekspresję większości indukowalnych chemokin, które biorą udział w stanie zapalnym organizmu (Moore, de Waal Malefyt et al. 2001). Między innymi reguluje wzrost oraz różnicowanie komórek B, komórek NK, cytotoksycznych i pomocniczych komórek T, komórek tucznych, granulocytów, komórek dendrytycznych, keratynocytów i komórek śródbłonna (Go, Castle et al. 1990; Chen and Zlotnik 1991; Moore, de Waal Malefyt et al. 2001). Dlatego określana jest jako wielofunkcyjna cytokina o działaniu pleiotropowym na większość typów komórek krwiotwórczych. Dodatkowo IL-10 silnie hamuje produkcję cytokin prozapalnych IL-6, IL-12, IL-18, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, kortyzolu, LIF i PAF przez aktywowane monocyty oraz makrofagi (Jankord and Jemioło 2004). Interleukina 10 jest syntetyzowana w ośrodkowym układzie nerwowym i działa w celu ograniczenia klinicznych

objawów udaru, stwardnienia rozsianego, choroby Alzheimera, zapalenia opon mózgowych i zmian behawioralnych, które występują podczas infekcji bakteryjnych. Ekspresja IL-10 jest podwyższona w przebiegu większości głównych chorób ośrodkowego układu nerwowego i sprzyja przeżyciu neuronów i wszystkich komórek glikowych w mózgu poprzez blokowanie działania cytokin proapoptotycznych i zwiększenia ekspresji sygnałów przeżycia komórek. IL-10 ogranicza również stan zapalny w mózgu przez trzy główne ścieżki jak zmniejszenie syntezy cytokin prozapalnych, hamowanie ekspresji receptora cytokin i hamowanie aktywacji receptora (Strle, Zhou et al. 2001). W układzie sercowo-naczyniowym IL-10 pełni rolę ochronną przed miażdżycą (Smith, Irving et al. 2001). W badaniu Smith, Irving et al. (2001) wykazali, że trening fizyczny zwiększa produkcję IL-10 i innych cytokin o działaniu przeciwzapalnym chroniących tym samym przed miażdżycą (IL-4, TGF- β 1) przez komórki jednojądrzaste, jednocześnie zmniejszając produkcję cytokin aterogennych (IL-1 α , TNF- α , IFN- γ) (Smith, Dykes et al. 1999; Jankord and Jemiolo 2004). Sądzi się, że poprzez zwiększanie lub utrzymywanie poziomu IL-10 za sprawą ćwiczeń można zapewnić ochronę tkanek podczas procesu starzenia dzięki zaangażowaniu w regulację odpowiedzi zapalnej i reakcji immunologicznej (Smith, Dykes et al. 1999; Jankord and Jemiolo 2004).

W ocenie wpływu IPC na poziom stanu zapalnego organizmu przed i po anaerobowej próbie wysiłku fizycznego posłużono się również zmianą stężenia interleukiny 15. Ludzka IL-15 została zgłoszona jednocześnie przez dwie grupy w 1994 roku jako czynnik wzrostu komórek T (Kwon, Moon et al. 2020). Ekspresję IL-15 wykryto w różnych komórkach i tkankach, w tym mięśniach szkieletowych, komórkach nabłonka, monocytach i komórkach dendrytycznych (Kwon, Moon et al. 2020). Oprócz efektów anabolicznych na mięśnie szkieletowe, IL-15 odgrywa znaczącą rolę w metabolizmie lipidów (Nielsen and Pedersen 2007). Wykazano, że IL-15 ma wpływ na obniżenie masy białej tkanki tłuszczowej (Carbo, Lopez-Soriano et al. 2001). Ponadto wywołuje apoptozę i rozkład komórek tłuszczowych. Dodatkowo włącza beta-oksydację i lipolizę prowadzące do degradacji trójglicerydów oraz hamuje lipogenezę (Carbo, Lopez-Soriano et al. 2001). Dlatego określa się, że IL-15 zmniejsza masę tkanki tłuszczowej (Nielsen, Mounier et al. 2007). Powszechnie wiadomo, że brak aktywności fizycznej prowadzi do utraty masy mięśniowej i nagromadzenia tłuszczu trzewnego. W badaniu Nielsen i wsp. wskazano, że IL-15 może brać czynny udział w regulacji rozwoju otyłości brzusznej. Na poparcie swojej hipotezy autorzy wykazali zmniejszenie trzewnej masy tłuszczowej z chwilą, gdy IL-15 ulegała nadekspresji w mysich mięśniach (Nielsen, Hojman et al. 2008). Quinn, Anderson et al. (2009) odkryli, że podwyższony poziom krążącej IL-15 u myszy skutkował także znacznym zmniejszeniem się

zawartości tkanki tłuszczowej i zwiększoną zawartością składników mineralnych kości, bez znaczącego wpływu na beztłuszczową masę ciała lub poziomy innych cytokin (Quinn, Anderson et al. 2009). Wskazane odkrycia potwierdzają pogląd, że wydzielanie IL-15 z tkanki mięśniowej może modulować trzewną masę tłuszczową, w szczególności poprzez mechanizm endokrynologiczny (Pedersen 2011). Jeśli chodzi o sygnalizację wewnątrzkomórkową, nowe obserwacje wykazały, że czynnik transkrypcyjny PPAR- α może odgrywać kluczową rolę w syntezie białek (Fuster, Busquets et al. 2009). Zatem IL-15 aktywuje czynnik transkrypcyjny i reguluje ekspresję różnych genów związanych z metabolizmem białek i tłuszczu. Oprócz tego IL-15 zwiększa zawartość transportera glukozy typu 4 (GLUT4) w komórkach mięśniowych. Dlatego uznaje się, że reguluje metabolizm białek i węglowodanów (Nielsen, Hojman et al. 2008). Ponadto niektóre badania wykazały, że IL-15 jest ważnym regulatorem masy mięśniowej w odpowiedzi na trening oporowy. Poziom miokin wzrasta podczas ćwiczeń wytrzymałościowych i oporowych, wpływając na reakcje mięśni szkieletowych. Co więcej, IL-15 wspomaga przyrost mięśni w wyniku adaptacji do ćwiczeń oporowych i wytrzymałościowych poprzez oddziaływanie na receptory znajdujące się na powierzchni komórek i inicjowanie wewnątrzkomórkowej kaskady sygnalizacyjnej. Ponadto IL-15 zwiększa metabolizm lipidów w wyniku ćwiczeń wytrzymałościowych (Nielsen, Mounier et al. 2007). W stanach atroficznych, takich jak zanik mięśni szkieletowych związany z wiekiem, występuje istotna, dodatnia korelacja między mRNA IL-15 a hamowaniem atrofii. Zatem przypuszcza się, że wzrost poziomu IL-15 w organizmie może być czynnikiem wyhamowującym redukcję masy układu mięśniowo-szkieletowego w okresie starzenia (Pistilli, Siu et al. 2007). W literaturze opisywany jest szereg schorzeń, w których istotną rolę odgrywa IL-15. Są to zwłaszcza niektóre choroby z autoagresji, ale także infekcje wirusowe, choroby alergiczne, zjawiska związane z przeszczepianiem komórek lub tkanek oraz niektóre choroby nowotworowe. Wykazano, że działanie terapeutyczne IL-15 w zaburzeniach nerwowo-mięśniowych (Harcourt, Schertzer et al. 2007). IL-15 ma pozytywny wpływ na funkcjonowanie układu odpornościowego. Dlatego w wielu prowadzonych badaniach próbuje się wykorzystać potencjał IL-15 do walki m.in. z nowotworami oraz wirusem HIV (Harcourt, Schertzer et al. 2007).

Niewątpliwie ważną cytokiną z punktu widzenia podjętej problematyki badań wydaje się neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego (BDNF). Jest jedną z najbardziej rozpowszechnionych i szeroko przebadanych neurotrofin w mózgu ssaków. Wśród jego głównych funkcji można wymienić kontrolę rozwoju, wzrostu i przeżycia neuronów oraz gleju. Znaczącą funkcją jest neuroprotekcja i modulacja zarówno krótkich jak i długotrwałych

interakcji synaptycznych, które są kluczowe dla funkcji poznawczych i pamięci. BDNF kontroluje szerokie spektrum procesów zachodzących w mózgu poprzez wyzwolenie kilku szlaków sygnałowych. Istotną kwestią w analizie funkcji BDNF jest ścisły związek z etapami rozwoju mózgu, składnikami komórkowymi tkanki nerwowej, a także molekularne mechanizmy przewodzenia sygnału aktywowane w warunkach fizjologicznych i patologicznych (Kowianski, Lietzau et al. 2018). Istnieje wiele miejsc w organizmie zdolnych do syntezy i uwalniania BDNF, ale głównym obszarem jest mózg. Próbkę biopsji hipokampu od dawców z chorobą Alzheimera wykazały zmniejszoną ekspresję BDNF (Cannon and Kluger 1983; Pedersen 2011), zaś próbki osocza osób chorych na Alzheimera wykazały niski poziom BDNF (Laske, Stransky et al. 2006; Pedersen 2011). Ponadto pacjenci zdiagnozowani z ciężką depresją mieli niższy poziom BDNF w surowicy niż pacjenci z grupy kontrolnej (Komulainen, Pedersen et al. 2008). Inne badania sugerują, że BDNF w osoczu jest biomarkerem wskazującym na stopień upośledzenia pamięci i ogólnych funkcji poznawczych u starzejących się kobiet (Matthews, Hosker et al. 1985). Został również zidentyfikowany jako kluczowy składnik szlaku podwzgórza, który kontroluje homeostazę masy ciała u osób dorosłych (Wisse and Schwartz 2003). Badania pokazują, że BDNF jest również wyrażany w tkankach nieneurogennych, w tym w mięśniach szkieletowych. Matthews, Astrom et al. (2009) wykazali, że odgrywa główną rolę nie tylko w centralnych szlakach metabolicznych, ale także jako regulator metabolizmu w mięśniach szkieletowych (Matthews, Astrom et al. 2009). Udowodniono, że ćwiczenia fizyczne mogą zwiększać poziom krążącego BDNF u ludzi. Zaobserwowano jego uwalnianie z mózgu w spoczynku i zwiększone trzykrotnie wydalenie podczas wysiłku. Zarówno w spoczynku, jak i podczas ćwiczeń mózg odpowiedzialny był za 70–80% syntezy BDNF, podczas gdy udział ten zmniejszył się po jednej godzinie regeneracji (Matthews, Hosker et al. 1985). U myszy wysiłek wywołał nawet pięciokrotny wzrost ekspresji mRNA BDNF w hipokampie i korze, osiągając maksimum dwie godziny po zakończeniu ćwiczeń. Działanie neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgowego jest potencjalnym mechanizmem leżącym u podstaw korzyści wynikających z wysiłku fizycznego i jest przedmiotem uwagi w literaturze poświęconej zdrowiu mózgu poprzez ćwiczenia fizyczne. Powszechnie wiadomo, że intensywne ćwiczenia zwiększają krążący poziom BDNF, a liczne badania miały na celu scharakteryzowanie tej odpowiedzi w celu poprawy zdrowia mózgu.

Kolejną omawianą w pracy cytokiną jest czynnik różnicowania wzrostu 15 (GDF-15), który początkowo został opisany jako czynnik hamujący makrofagi-1 (MIC-1) przez Bootcov, Bauskin et al. (1997). W 1997 roku określono, że MIC-1 posiada cechy strukturalne

cytokiny z nadrodziny transformującego czynnika wzrostu β (TGF- β) (Desmedt, Desmedt et al. 2019). W przeszłości GDF-15 opisywany był również jako czynnik pochodzący z prostaty, gen aktywowany przez NLPZ i łóżyskowy TGF- β (George, Jena et al. 2016). Chociaż należy do tej samej nadrodziny, nie stwierdzono wówczas jego silnej homologii z istniejącymi cytokinami. Fakt ten zadecydował, że ostatecznie został pierwszym członkiem nowej grupy (Bootcov, Bauskin et al. 1997). Do tej pory wykazano, że jego stężenie we wszystkich typach tkanek w normalnych stanach fizjologicznych jest na niskim poziomie. Dokładna funkcja GDF-15 nadal podlega szczegółowym analizom, a sam GDF-15 jest badany pod kątem prognozowania wszelkich chorób jako ich biomarker (Galliera, Lombardi et al. 2014; Wischhusen, Melero et al. 2020). Podwyższone poziomy GDF-15 są głównie związane ze stanami patologicznymi, w tym stanem zapalnym, niedokrwieniem mięśnia sercowego i chorobami nowotworowymi. Istnieją liczne badania, że GDF-15 ulega ekspresji w wielu nowotworach, takich jak rak trzustki, sutka, jajnika, jelita grubego, żołądka, czerniaka oraz glejaka (George, Jena et al. 2016). Zatem wyniki tych badań potwierdzają, że GDF-15 może być uważany za marker prognostyczny do identyfikacji objawów i progresji raka. Ponieważ GDF-15 jest jednym z najczęściej nadekspresjonowanych białek w ludzkich nowotworach, wysokie poziomy GDF-15 w surowicy są niezmiennie związane ze złym rokowaniem w chorobie. Zwiększoną ekspresję GDF-15 obserwowano także w chorobach płuc, serca czy nerek (Hunt and White 2016). Podobnie obserwacje poczyniono u kobiet ze stanem przedrzucawkowym, wykazując u nich podwyższony poziom GDF-15, co sugeruje, że jest potencjalnym biomarkerem służącym do śledzenia ciąży i powikłań związanych z tym stanem (George, Jena et al. 2016). Inne badania sugerują, że różne formy stresu sercowego, w tym przeciążenie ciśnieniowe, także zwiększają stężenie GDF-15. Dlatego marker ten jest połączony ze śmiertelnością z przyczyn sercowo-naczyniowych i nowotworowych (George, Jena et al. 2016). Ponadto zaobserwowano umiarkowany wzrost poziomu GDF-15 we krwi wraz z wiekiem (Galliera, Lombardi et al. 2014; Wischhusen, Melero et al. 2020). GDF-15 będąc cytokiną indukowaną stresem, jest regulowany przez kilka białek zapalnych takich jak: interleukina 1 β , interleukina 6, czynnik martwicy nowotworu, interleukina 2 i homeostazę żelaza (Galliera, Lombardi et al. 2014; Wischhusen, Melero et al. 2020). Różne typy komórek wykazują ekspresję GDF-15 m.in. kardiomiocyty, adipocyty, makrofagi, śródbłonkowe i naczyniowe komórki mięśni gładkich zarówno w zdrowych, jak i chorych tkankach (Galliera, Lombardi et al. 2014; Wischhusen, Melero et al. 2020). Jako cytokina zapalna wywołana stresem, ekspresja GDF-15 jest często zwiększona po uszkodzeniu tkanek mięśni gładkich. Dowodzą tego badania z ostatnich lat, wskazując na białko GDF-15 jako cytokinę

indukowaną wysiłkiem fizycznym. W jednym z badań przeprowadzonych na sportowcach płci męskiej wykazano istotny wzrost stężenia GDF-15 w osoczu na koniec ultramaratonu (Tchou, Margeli et al. 2009; Gil, Ost et al. 2019). W innym badaniu wykonanym na graczach rugby, intensywne ćwiczenia także zwiększyły poziom GDF-15 w surowicy, co zostało skorelowane z ryzykiem sercowo-naczyniowym, który może wystąpić podczas maksymalnego wysiłku (Galliera, Lombardi et al. 2014). Wzrost poziomu GDF-15 w surowicy zaobserwowano również u piłkarzy hiszpańskiej piłki nożnej 12 godzin po zakończeniu meczu (Sanchis-Gomar, Bonaguri et al. 2013; Galliera, Lombardi et al. 2014). Natomiast wyniki badań na myszach sugerują inną hipotezę niż przedstawiają powyższe badania, ponieważ poziom ekspresji mRNA w tym badaniu był bardzo niski i nie odnotowano w nim wzrostu stężenia GDF-15 w osoczu po wysiłku. Autorzy przytoczonej publikacji zasugerowali, że GDF-15 może przyczyniać się do łagodzenia tylko ostrego zapalenia mięśni szkieletowych wywołanego wysiłkiem fizycznym (Gil, Ost et al. 2019). Zatem wydaje się, że GDF-15 odgrywa szeroką i różnorodną rolę w różnych stanach fizjologicznych, w tym wysiłku fizycznym (Wischhusen, Melero et al. 2020). Wniosek ten przyczynił się do włączenia GDF-15 do analizy badań niniejszej pracy doktorskiej.

Od dawna trwają szeroko zakrojone poszukiwania czynników pośredniczących w korzystnych efektach wysiłku fizycznego. Badaniom poddaje się w szczególności tkankę mięśni szkieletowych jako źródło krążących czynników wysiłkowych, które zidentyfikowano jako miokiny. Chociaż wiadomo, że wysiłek fizyczny ma również wpływ na inne tkanki organizmu, niedawno pojawiła się nowa grupa czynników ćwiczeń fizycznych zwanych hepatokinami. Są to białka m.in. czynnika wzrostu fibroblastów 21, folistatyny, białka podobnego do angiopoetyny 4, białka szoku cieplnego 72, białka wiążącego insulinopodobny czynnik wzrostu 1, które uwalniane są z wątroby do krwioobiegu podczas lub po wysiłku fizycznym (Weigert, Hoene et al. 2019). W omawianej pracy analizie poddana została także hepatokina o nazwie Folistatyna 1. Chociaż FSTL-1 jest częścią rodziny folistatyny, ma bardzo niską homologię sekwencji białka do folistatyny (7%), jak również istnieje kilka różnic strukturalnych i funkcjonalnych między nimi (Miller, Beppu et al. 2015). Początkowo Folistatyna 1 została zidentyfikowana jako indukowalny gen TGF- β . Obecnie wiadomo, że jest generowana w szczególności przez komórki niehematopoetyczne jak fibroblasty, chondrocyty, osteocyty, adipocyty, kardiomiocyty (Miller, Beppu et al. 2015). W ostatniej dekadzie FSTL-1 została zidentyfikowana jako nowe białko zapalne, zwiększające syntezę cytokin prozapalnych (IL1 β , TNF α , IL6, IFN γ , OSM) i chemokin (IL8, MCP1, IL10) przez komórki odpornościowe: monocyty, makrofagi i komórki T (Chaly, Hostager et al. 2014;

Miller, Beppu et al. 2015). FSTL-1 jest zaangażowana w wiele funkcji komórkowych typu przeżycie, proliferacja, różnicowanie, migracja i rozwój narządów (Miller, Beppu et al. 2015). Liczne badania wykazały, że FSTL-1 pełni funkcje w rozwoju embrionalnym, chorobach serca (Ogura, Ouchi et al. 2012), zapaleniu stawów (Chaly, Hostager et al. 2014; Li, Alahdal et al. 2020), gojeniu się ran (Li, Li et al. 2013), rozwoju guza, przerzutach i stanach zapalnych (Li, Alahdal et al. 2020). Wydaje się, że dominujący wpływ FSTL-1 jest prozapalny (Chaly, Hostager et al. 2014; Miller, Beppu et al. 2015), chociaż zostały opisane również jej działania przeciwzapalne (Miller, Beppu et al. 2015). W stanach zapalnych podczas różnych chorób wykazano podwyższony poziom FSTL-1 i jej obniżenie w trakcie leczenia. Z kolei w badaniu urazu niedokrwienego serca poprzez podanie myszom ludzkiego białka FSTL-1 znacząco zmniejszono rozmiar zawału mięśnia sercowego, jak również nastąpiło zmniejszenie apoptozy i odpowiedzi zapalnej (Ogura, Ouchi et al. 2012). W fizjologicznej reakcji na zapalenie przypuszcza się, że FSTL-1 ma dwie przeciwstawne aktywności. Jedną z nich jest zapobieganie niszczeniu tkanek, a drugą sprzyjanie zapaleniu (Murakami, Tanaka et al. 2012). Uważa się także, że białko podobne do folistatyny-1 jest adipokina lub miokina, które może być potencjalnym regulatorem metabolizmu (Xu, Zhang et al. 2020). Te działania metaboliczne mogą obejmować glikogenolizę, glikogenezę, brązowienie adipocytów, wydatek energetyczny (termogenezę), lipolizę, insulino oporność i kilka innych działań (Barbalho, Prado Neto et al. 2020). Co ciekawe, poziomy krążącego FSTL-1 u osób z cukrzycą typu 2, nadwagą bądź otyłością były wyższe niż u osób zdrowych i szczupłych. W tym samym badaniu stwierdzono, że 45 minutowa aktywność fizyczna istotnie zwiększyła stężenie krążącego FSTL-1 u młodych, zdrowych uczestników. Ponadto ekspresja białka FSTL-1 w tkance tłuszczowej myszy także wzrosła istotnie w odpowiedzi na aktywność fizyczną (Xu, Zhang et al. 2020). Podobne wyniki uzyskano badając maratończyków, u których stwierdzono 28,3% wzrostu stężenia FSTL-1 w surowicy po zakończonym wyścigu (Mieszkowski, Stankiewicz et al. 2020). Dlatego wnioskuje się, że FSTL-1 może być znaczącym biomarkerem dla ogólnoustrojowych stanów zapalnych organizmów (Chaly, Hostager et al. 2014).

Angiogeneza jest regulowana przez szeroką gamę mediatorów, które są uwalniane lokalnie lub przez odległe narządy, wpływając tym samym na lokalną angiogenezę poprzez zmiany ogólnoustrojowe. Poziomy mediatorów angioregulacyjnych w surowicy są ważne dla angiogenezy mięśni w odpowiedzi na aktywność fizyczną (Bruserud, Grovan et al. 2005). Dlatego w zaprezentowanej pracy doktorskiej słusznym wydało się wykonanie analiz stężenia

angiogeniny i angiopoetyny po wykonaniu zdalnego hartowania przez niedokrwienie indukowanego maksymalnym wysiłkiem fizycznym.

Angiogenina (ANG) została po raz pierwszy scharakteryzowana przez Fett, Strydom et al. (1985) w 1985 roku. Stwierdzono, że jest to pierwsze ludzkie białko pochodzące z linii komórek ludzkiego gruczolakoraka (HT-29) stymulujące wzrost naczyń krwionośnych, co może stanowić bezpośredni dowód na poparcie hipotezy, że wzrost guza jest zależny od rozwoju naczyń (Fett, Strydom et al. 1985). W licznych badaniach wykazano, że angiogenina jest silnym stymulatorem angiogenezy. W związku z tym oddziałuje z komórkami śródbłónki oraz indukuje szeroki zakres odpowiedzi komórkowych, inicjując proces tworzenia się nowych naczyń krwionośnych (Pyatibratov and Kostyukova 2012). Ponadto należy do nadrodziny rybonukleaz, czyli enzymów o wrodzonej specyficzności substratowej. Angiogenina jest również składnikiem osocza, płynu owodniowego, mikrośrodowiska guza i płynu mózgowo-rdzeniowego (Sheng and Xu 2016). Rozpowszechniony wzorzec ekspresji ANG sugeruje, że jej fizjologiczne i patologiczne funkcje nie ograniczają się do neowaskularyzacji. Stwierdzono, że ANG bierze udział w wielu innych procesach patofizjologicznych w tym neuroprotekcji, odporności wrodzonej, rozmnażaniu i regeneracji uszkodzonych tkanek (Sheng and Xu 2016). Dowiedziono również, że ekspresja ANG zwiększa się w różnych typach nowotworów człowieka, w tym raku piersi, szyjki macicy, okrężnicy, jelita grubego, żołądka, wątroby, nerki, jajnika, trzustki, prostaty i nabłonka dróg moczowych oraz w białaczkach, chłoniaku, czerniaku, kostniakomięsaku i guzie Wilmsa (Gao and Xu 2008). Dostępne dane wskazują, że ANG wpływa na prawie wszystkie etapy powstawania nowotworów, w tym na ochronę komórek nowotworowych przed złymi warunkami przeżycia, promowanie proliferacji komórek nowotworowych, nasilanie migracji i inwazji komórek nowotworowych oraz indukowanie angiogenezy (Sheng and Xu 2016). Angiogenina odgrywa również rolę w wielu niezłośliwych stanach patologicznych, takich jak endometrioza, choroba naczyń obwodowych, nieswoiste zapalenie jelit, reumatoidalne zapalenie stawów, cukrzyca typu pierwszego, stwardnieniu zanikowym bocznym i chorobie Parkinsona. Dlatego zmiana poziomu ANG w surowicy może potencjalnie wskazywać na którąś z tych chorób (Sheng and Xu 2016). Udowodniono także, że angiogenina odgrywa znaczącą rolę podczas ciąży. Ciąża jest stanem fizjologicznym, który wyzwała angiogenezę i przebudowę naczyń w zdrowych tkankach. Stężenie ANG w surowicy krwi kobiet ciężarnych wzrasta w czasie prawidłowych ciąż, co sugeruje, że ANG może odgrywać rolę we właściwym rozwoju naczyń w okresie okołoporodowym (Tello-Montoliu, Patel et al. 2006). Natomiast poziom angiogeniny jest znacznie obniżony u pacjentek

ciężarnych z wysoce patologicznym przepływem Dopplera (Tello-Montoliu, Patel et al. 2006). ANG jest zaangażowana również w układ odpornościowy i stan zapalny, na co wskazuje zwiększenie tRNA zależnego od ANG w przewlekłym zapaleniu wątroby typu B i C. Można zatem wnioskować, że ANG także odgrywa istotną rolę w infekcji wirusowej (Sheng and Xu 2016). W przeglądzie na temat angiogeniny można przeczytać, że jest indukowana podczas zapalenia, wykazuje właściwości gojenia ran, a także działa bakteriobójczo i odpornościowo. Dzieje się tak za sprawą roli angiogeniny w powstaniu nowych naczyń krwionośnych, poprzez które następuje dostarczenie składników odżywczych i tlenu do rosnących tkanek. Ponadto, poprzez stymulację aktywności proteazy, angiogenina przyczynia się do procesu zapalnego, który umożliwia migrację komórek śródbłonna i mięśni gładkich przez błonę podstawną do miejsca urazu (Tello-Montoliu, Patel et al. 2006). Zbadano także wpływ aktywności fizycznej na poziom angiogeniny w ludzkiej surowicy. Poziomy ANG zostały określone bezpośrednio przed i po aktywności fizycznej dla młodych sportowców oraz osób starszych w wieku powyżej 68 lat. W tym badaniu osoby starsze wykazały wyższy poziom angiogeniny w spoczynku niż grupa młodych sportowców. Natomiast wyższy poziom angiogeniny po 45 minutach intensywnego wysiłku fizycznego wystąpiły w grupie młodych mężczyzn, czego nie zaobserwowano w grupie osób starszych (Bruserud, Grovan et al. 2005). Podobny rezultat odnotowano poddając trzytygodniowemu treningowi aerobowemu grupę osób po 65 roku życia chorujących na przewlekłą niewydolność serca. Na podstawie analizy próbek surowicy krwi nie stwierdzono istotnych zmian w poziomie angiogeniny po okresie treningowym (Eleuteri, Mezzani et al. 2013). Innym białkiem odgrywającym ważną rolę w angiogenezie, w tym rozwoju nowych naczyń krwionośnych, jest angiopoetyna (ANGPT). Angiopoetyny to rodzina naczyniowych czynników wzrostu, które pełnią wiele funkcji komórkowych związanych z przeżyciem, proliferacją i migracją komórek. Grupa angiopoetyny (Angs) obejmuje Ang1, Ang2, Ang3 i Ang4, które oddziałują na receptory kinazy tyrozynowej (Tie1 i Tie2). Szlak sygnałowy Ang-Tie odgrywa ważną rolę w angiogenezie, w tym w przebudowie naczyń, przepuszczalności i ich stabilizacji w celu utrzymania homeostazy naczyniowej. Ponadto regulują reaktywność naczyniową poprzez regulację produkcji tlenu azotu oraz zmian zapalnych (He, Zhang et al. 2019). Wiele tych procesów powiązanych jest z chorobami, w których układ naczyniowy odgrywa istotną rolę np.: nowotwory, posocznica, cukrzyca, miażdżycy tętnic, choroby oczu i nerek. Dodatkowo szlak angiopoetyny (Ang –Tie) stanowi drugi szlak sygnałowy receptora śródbłonkowego czynnika wzrostu, który pełni niezbędną

funkcję regulacji przebudowy naczyń krwionośnych i limfatycznych w trakcie porodu (He, Zhang et al. 2019).

Do tej pory najlepiej scharakteryzowano angiopoetynę-1 (ANGPT1) i angiopoetynę-2 (ANGPT2). ANGPT1 jest silnym angiogennym czynnikiem wzrostu, podczas gdy ANGPT2 została początkowo zidentyfikowana jako czynnik niszczący naczynia krwionośne o działaniu antagonistycznym przez ten sam receptor (Akwii, Sajib et al. 2019). ANGPT1 jest wytwarzana i wydzielana do krwi przez perycyty i komórki mięśni gładkich, po czym jest przechowywana w płytkach krwi. ANGPT1 wiąże się z receptorem Tie-2, działając w ten sposób jako agonista. Po oddziaływaniu ANGPT1 na Tie-2, najważniejszym zdarzeniem sygnalizacyjnym w dalszej części szlaku jest fosforylacja kinazy białkowej B przez kinazę fosfoinozytydo-3, co skutkuje stanem przeciwapoptotycznym i przeciwzapalnym komórki śródbłonna. Natomiast ANGPT2 jest wytwarzana w komórkach śródbłonna i wstępnie przechowywana jest w ciałach Weibela-Palade'a. Zwiększony stosunek ANGPT2 do ANGPT1 powoduje zastąpienie interakcji ANGPT1-Tie-2 przez oddziaływanie ANGPT2-Tie-2, co skutkuje blokowaniem ochronnego, przeciwzapalnego i przeciwapoptotycznego działania ANGPT1. Dlatego uważa się, że uwalnianie ANGPT2 i wiązanie się z receptorami Tie-2 dodatkowo stymuluje odpowiedź zapalną komórek śródbłonna. Spadek stężenia ANGPT1 w stanach prozapalnych również przyczynia się do wzrostu stosunku ANGPT2 do ANGPT1. Mechanizmy leżące u podstaw spadku ANGPT1 nie zostały jeszcze precyzyjnie zdefiniowane (de Jong, Slager et al. 2016). W przypadku badań na zwierzętach, myszy z nokautem ANGPT1 lub Tie2 miały większą śmiertelność embrionalną z powodu wadliwego rozwoju naczyń krwionośnych. Dlatego sygnał ANGPT1-Tie2 uważa się, że odgrywa kluczową rolę w dojrzewaniu i stabilizacji układu naczyniowego zarodka (Jeansson, Gawlik et al. 2011). Ponadto angiopoetyna1 uważana jest za ważny czynnik utrzymujący stabilizację naczyniową w dojrzałych naczyniach. Ochronną rolę naczyń krwionośnych ANGPT1 osiąga poprzez jej działanie przeciwzapalne polegające na hamowaniu transmigracji leukocytów we włósciczkach leukocytarnych indukowanych czynnikiem martwicy nowotworu- α (He, Zhang et al. 2019). Wyniki badań pokazują, że ANGPT1 jest niezbędna do ograniczania angiogenezy i zwłóknienia po urazie (Jeansson, Gawlik et al. 2011; He, Zhang et al. 2019). Obecnie w literaturze naukowej najprawdopodobniej nie poświęcono uwagi analizom wpływu wysiłku fizycznego na angiopoetynę.

Kolejnym białkiem istotnym w angiogenezie i rozwoju mięśni szkieletowych jest tkankowy inhibitor metaloproteinazy1. Uważa się go za główne białko umożliwiające zachowanie integralności tkanki, a ostatnio stał się również decydującym czynnikiem w wielu

chorobach. Wszechstronny wpływ TIMP-1 na funkcje komórkowe wynika z jego dwudomenowej struktury umożliwiającej hamowanie metaloproteinazy macierzy i tym samym udział w przebudowie tkanki macierzy zewnątrzkomórkowej (Lambert, Dasse et al. 2004; Grunwald, Schoeps et al. 2019). Cecha ta prowadzi do funkcjonalnych interakcji z licznymi białkami enzymatycznymi i białkami powierzchni komórki, które inicjują wyjątkowo szeroki zakres efektów (Verstappen and Von den Hoff 2006; Alameddine 2012; Grunwald, Schoeps et al. 2019). Istotna jest w tym przypadku równowaga między aktywnością MMP a jej hamowaniem przez TIMP, co zapewnia homeostazę ECM. Ponadto określony poziom tych dwóch związków związany jest zarówno ze zdarzeniami normalnymi, jak i patologicznymi, np.: gojenie się ran, przebudowa tkanek, angiogeneza, powstawanie guzów i przerzutów (Lambert, Dasse et al. 2004). Pierwszy raz TIMP został opisany w 1975 roku jako białko w hodowli ludzkich fibroblastów i ludzkiej surowicy, które było w stanie zahamować aktywność kolagenazy (Bauer, Stricklin et al. 1975; Woolley, Roberts et al. 1975). Od tego czasu zostały odkryte trzy nowe TIMP i określone jako TIMP-2, TIMP -3 i TIMP-4. Tkankowe inhibitory metaloproteinazy mogą być wytwarzane przez wiele różnych typów komórek i znajdują się we wszystkich płynach ustrojowych, takich jak ślina, płyn szczylinowy dziąsłowy, surowica i mocz (Lambert, Dasse et al. 2004; Verstappen and Von den Hoff 2006). Poziomy MMP i TIMP zmieniają się w trakcie procesów fizjologicznych i patologicznych (Verstappen and Von den Hoff 2006). Wykazano, że TIMP jest użytecznym biomarkerem różnych chorób umożliwiającym wykrycie wczesnego stadium choroby określonego narządu. U pacjentów z dystrofią mięśniową Duchennea zwiększone poziomy metaloproteinazy macierzy-9 (MMP-9) i tkankowego inhibitora metaloproteinazy1 zostały skorelowane z nasileniem choroby (Nadarajah et al., 2011). W przypadku łagodnego przebiegu choroby stwardnienia zanikowego bocznego stwierdzono także wzrost TIMP-1 w surowicy u większości przebadanych pacjentów. Podwyższone poziomy TIMP-1 w surowicy i osoczu wykryto również u pacjentów z chorobami zwłóknieniowymi oraz pacjentów z dystrofią mięśniową (Jackson, Defamie et al. 2017). Metaloproteinazy macierzy, a także ich inhibitor tkankowy TIMP-1 bierze udział w rozwoju tkanki mięśni szkieletowych, w procesach naprawczych wynikających z urazu mięśni oraz w modyfikacjach adaptacyjnych wywołanych wysiłkiem fizycznym w mięśniach szkieletowych (Lo Presti, Hopps et al. 2017). Wiadomo również, że uszkodzony mięsień powoduje wzrost poziomu metaloproteinazy macierzy-9 i tkankowego inhibitora metaloproteinazy-1, tworząc tym samym wspólny kompleks. Podczas gdy odpowiednia równowaga między tymi białkami może sprzyjać regeneracji mięśni i regulować rozwój włókien, każda nieprawidłowość w ich równowadze

lub nadmierna aktywność może prowadzić do zwłóknienia. Dowodzą tego badania urazów mięśni wywołanych wysiłkiem ekscentrycznym, które przyczyniły się do zmian poziomu ekspresji MMP-9, TIMP-1 (Koskinen, Hoyhtya et al. 2001; Lo Presti, Hopps et al. 2017). Natomiast w warunkach eksperymentalnych TIMP-1 wzrastał w niewielkim stopniu po wykonanym biegu na bieżni w surowicy poddanych badaniu mężczyzn (Koskinen, Hoyhtya et al. 2001). W innym badaniu TIMP-1 wykazywał wczesny i długotrwały wzrost stężenia po ekscentrycznym wysiłku kończyny dolnej (Mackey, Donnelly et al. 2004). Tego wyniku nie potwierdziło kolejne badanie, w którym stężenie TIMP-1 po ekscentrycznych ćwiczeniach ramienia nie wykazało zmian w surowicy (Madden, Byrnes et al. 2011). Również w grupie zdrowych kobiet po menopauzie ośmiodniowy trening marszu obejmujący 60% do 65% tętna maksymalnego nie spowodował zmian w poziomach TIMP-1 (Kadoglou, Vrabas et al. 2010; Lo Presti, Hopps et al. 2017). Zatem białko TIMP-1, które hamuje degradację macierzy zewnątrzkomórkowej, wykazało zróżnicowaną odpowiedź w odniesieniu do odpowiednich stadiów degeneracji i regeneracji uszkodzeń mięśni. Może to wskazywać na ważną reakcję tkanek na powtarzające się obciążenia występujące w treningu fizycznym, jak i okres regeneracji niezbędny do odnowy biologicznej mięśni (Koskinen, Wang et al. 2001). Być może TIMP-1 jest aktywowany we wczesnej fazie uszkodzenia mięśni, dlatego w niektórych badaniach nie został wykryty z powodu późniejszych punktów czasowych (Koskinen, Wang et al. 2001).

Omówione powyżej markery biochemiczne to białka sygnalizujące stan zapalny na skutek mikrouszkodzeń powstałych w wyniku pracy mięśni szkieletowych zaangażowanych podczas wysiłku fizycznego. Złożoność oddziaływania omówionych białek wynika z przeciwległych mechanizmów działania (pro i przeciwzapalnych). Celowe zastosowanie stymulacji zewnętrznej w postaci RIPIC na włókna mięśniowe może spowodować aktywację kaskad wewnątrzkomórkowych i zmianę w równowadze oksydacyjnej w kierunku procesów antyzapalnych. Manifestacją tych procesów może być działanie ochronne wywołane procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie. z powyższych przesłanek niniejsza praca, jako pierwsza, ma na celu ukazanie roli wybranych białek w utrzymaniu homeostazy po jednorazowej oraz dziesięciodniowej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie indukowanej maksymalnym wysiłkiem anaerobowym w postaci 30 sekundowego Wingate Test.

II METODOLOGIA BADAŃ WŁASNYCH

2.1. Cel badań

1. Ocena wpływu jednorazowej i 10 dniowej procedury zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej na poziom maksymalnych możliwości anaerobowych.
2. Ocena wpływu jednorazowej i 10 dniowej procedury zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej na zmiany stężenia wybranych markerów stanu zapalnego w odpowiedzi na maksymalny wysiłek anaerobowy.

2.2. Pytania badawcze

1. Czy zastosowanie jednorazowej bądź 10 dniowej procedury zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej może mieć istotny wpływ na poprawę maksymalnych możliwości anaerobowych?
2. Czy jednorazowa bądź 10 dniowa procedura zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej może mieć istotny wpływ na stężenie kwasu mlekowego i glukozy we krwi indukowanych maksymalnym wysiłkiem anaerobowym?
3. Czy jednorazowa bądź 10 dniowa procedura zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej może wywołać istotne zmiany spoczynkowego poziomu stężenia wybranych markerów stanu zapalnego w surowicy krwi?
4. Czy jednorazowa bądź 10 dniowa procedura zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej może mieć istotny wpływ na zmiany stężenia wybranych markerów stanu zapalnego w surowicy krwi indukowanych maksymalnym wysiłkiem anaerobowym?

2.3. Hipotezy badawcze

1. Jednorazowa i 10 dniowa procedura zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej może mieć odmienny wpływ na poziom maksymalnych możliwości anaerobowych.
2. Zarówno jednorazowa jak i 10 dniowa procedura zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej może istotnie wpłynąć na zmiany stężenia kwasu mlekowego i glukozy we krwi indukowanego maksymalnym wysiłkiem anaerobowym.
3. Zarówno jednorazowa jak i 10 dniowa procedura zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej może wywołać istotne zmiany spoczynkowego stężenia wybranych markerów stanu zapalnego w surowicy krwi.
4. Jednorazowa i 10 dniowa procedura zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej może spowodować istotne zmiany poziomu stężenia wybranych markerów stanu zapalnego w surowicy krwi indukowanych maksymalnym wysiłkiem anaerobowym.

2.4. Charakterystyka badanych osób

W badaniach wzięło udział 40 zdrowych aktywnych fizycznie mężczyzn w wieku $19,98 \pm 1,17$ lat, nietreningujących zawodowo żadnej dyscypliny sportowej oraz nierywalizujących w zawodach sportowych. Rekrutacja badanych osób została przeprowadzona na podstawie doboru celowego poprzez otwarte ogłoszenie oraz listy intencyjne. Kryterium wykluczenia osób z badania były choroby o podłożu nerwowo-mięśniowym, zaburzenia sercowo-naczyniowe, nowotwory, nadczynność przytarczycy i tarczycy, zaburzenia o charakterze psychicznym, choroby układu nerwowego oraz układu krążenia, przyjmowanie leków w czasie trwania badań mogące w sposób istotny przyczyniać się do problemów z wykonaniem prób wysiłkowych i prób badawczych. Ostatecznie 2 osoby zostały wykluczone z powodu infekcji górnych dróg oddechowych oraz jedna osoba z powodu urazu w stawie nadgarstkowym. Przeprowadzone badania zostały zatwierdzone przez Komitet Bioetyczny ds. Badań Klinicznych przy Okręgowej Izbie Lekarskiej w Gdańsku (KB-24/16) i zrealizowane zgodnie z Deklaracją Helsińską. Wszyscy uczestnicy wyrazili pisemną, świadomą zgodę na udział w badaniach i zostali poinformowani o możliwości wycofania się w dowolnym momencie z badań.

2.5. Metody i techniki badawcze

W badaniu zastosowano metodę eksperymentu. Sposób gromadzenia danych empirycznych zrealizowano przy użyciu technik impedancji bioelektrycznej, cykloergometrycznego pomiaru wysiłku oporowego, sfigmomanometrycznego pomiaru podczas zastosowania procedury hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej skontrolowanej badaniem ultrasonograficznym. Oznaczenie biochemiczne wykonano techniką enzymatyczno-amperometryczną i spektrofotometrii. Uzyskane dane empiryczne poddano szczegółowej analizie statystycznej.

2.6. Narzędzia badawcze

2.6.1. Pomiary antropometryczne

Do pomiarów wysokości ciała wykorzystany został antropometr z zestawu instrumentów pomiarowych GPM 101 (DKSH, Zurych, Szwajcaria). W badaniu określono również segmentalne wartości beztłuszczowej masy ciała oraz rozkład tkanek organizmu przy użyciu aparatury InBody 720 firmy Biospace (Korea). Badanie zostało zrealizowane w godzinach porannych, zgodnie z przyjętym standardem oznaczeń oraz z uwzględnieniem kryteriów wykluczających stosowanie tej metody. W okresie przeprowadzanego eksperymentu badani nie zmieniali nawyków żywieniowych, nie przyjmowali leków mogących wpłynąć na dane pomiarowe, nie wykonywali intensywnych treningów sportowych.

Uzyskanie precyzyjnych danych do oceny budowy i składu ciała badanych osób pozwoliło na wykluczenie dodatkowych czynników związanych ze zmiennością masy tkankowej i wody w organizmie, które mogły wpływać na wynik związany z problematyką badań.

2.6.2. Pomiar wydolności beztlenowej kończyn dolnych

Do oceny maksymalnych możliwości anaerobowych kończyn dolnych wykorzystano test opracowany przez Bar-Or (1987) pod nazwą Wingate Anaerobic (WAnT) w wersji 30 sekundowej z pełnym oporem koła zamachowego od początku wysiłku. Pomiary wysiłkowe wykonywane były na ergometrze rowerowym Ergomedic 894E firmy Monark z dobieranym indywidualnie obciążeniem (0,075kg) na kilogram masy ciała w teście na kończyny dolne. Do określenia maksymalnych możliwości anaerobowych kończyn dolnych wykorzystano

następujące wskaźniki: szczytowa moc (W), szczytowa moc znormalizowaną do masy ciała (W/kg), średnią moc (W), średnią moc znormalizowaną do masy ciała (W/kg) oraz wskaźnik spadku mocy (%) wyrażony ilorazem pracy, która nie została wykonana do pracy, która byłaby wykonana, gdyby do końca wysiłku rozwijano moc maksymalną, gdzie; FI = indeks zmęczenia, t = czas, P = moc, PP = moc szczytowa, PPt = czas do mocy szczytowej, tf = czas zakończenia testu.

$$FI = \left(1 - \frac{\int_{PPt}^{tf} P(t) \cdot dt}{PP \cdot (tf - PPt)} \right) \cdot 100\%$$

Do obliczeń wskaźników mechanicznych w teście wykorzystany został program komputerowy MCE v 5.1 (Staniak 1994, Instytut Sportu, Polska).

2.6.3. Analiza krwi i oznaczenia biochemiczne

Krew żylna i włosniczkowa została pobrana od wszystkich uczestników badań przez wykwalifikowany personel medyczny. Krew włosniczkową z opuszka palca pobrano do plastikowych kapilar (20 µL), a następnie wstrzyknięto do eppendorfów typu „Safe-Lock” wypełnionych odczynnikiem. Przygotowane próbki krwi zostały zamrożone w temperaturze - 20°C. Do oznaczenia mleczanu i glukozy we krwi włosniczkowej wykorzystano zautomatyzowany aparat Biosen C line firmy EKF diagnostics, Niemcy. Glukoza i mleczan zawarte w próbce zostały przekształcone enzymatycznie za pomocą unieruchomionego enzymu oksydazy glukozowej i oksydazy mleczanowej. Produktami reakcji był kwas glukonowy, pirogronian i nadtlenek wodoru. Krew żylna została pobrana do odpowiednich, standaryzowanych probówek firmy BD Vacutainer, USA. Z pobranych prób została wyizolowana surowica a próbki zostały zamrożone w temperaturze - 80°C do czasu oznaczeń (nie dłużej niż 12 miesięcy). Wybrane cytokiny: angiogenina, angiopoetyna, neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego, folistatyna, różnicujący czynnik wzrostu, interleukina 6, interleukina 10, interleukina 15, czynnik hamujący białaczkę, onkostatyna M, inhibitor metaloproteinaz 1 zostały oznaczone za pomocą testów Luminex (Luminex Corporation) zintegrowanych z urządzeniem MAGPIX (Luminex Corp., Austin, TX, USA) opierającym się na pomiarze fluorescencji wykorzystującej technologię obrazowania CCD.

2.7. Procedury badań

2.7.1. Pierwszy etap badań

Dziesięć dni przed rozpoczęciem badań wszyscy uczestnicy wypełnili arkusz aktywności fizycznej - Global Physical Activity Questionnaire (GPAQ) – WHO (z ang. *World Health Organization*) w adaptacji polskiej. Kwestionariusz GPAQ składał się z czterech niezależnych części zawierających 16 pytań. Pytania dotyczyły czasu poświęconego na aktywność fizyczną trwającą minimum 10 minut bez przerwy w ciągu typowego dla respondenta tygodnia. Pierwsze trzy części kwestionariusza obejmowały aktywność w pracy, aktywność w przemieszczaniu się oraz aktywność rekreacyjną. W czwartej części kwestionariusza pytanie dotyczyło czasu spędzonego na siedzeniu lub odpoczynku w pozycji leżącej.

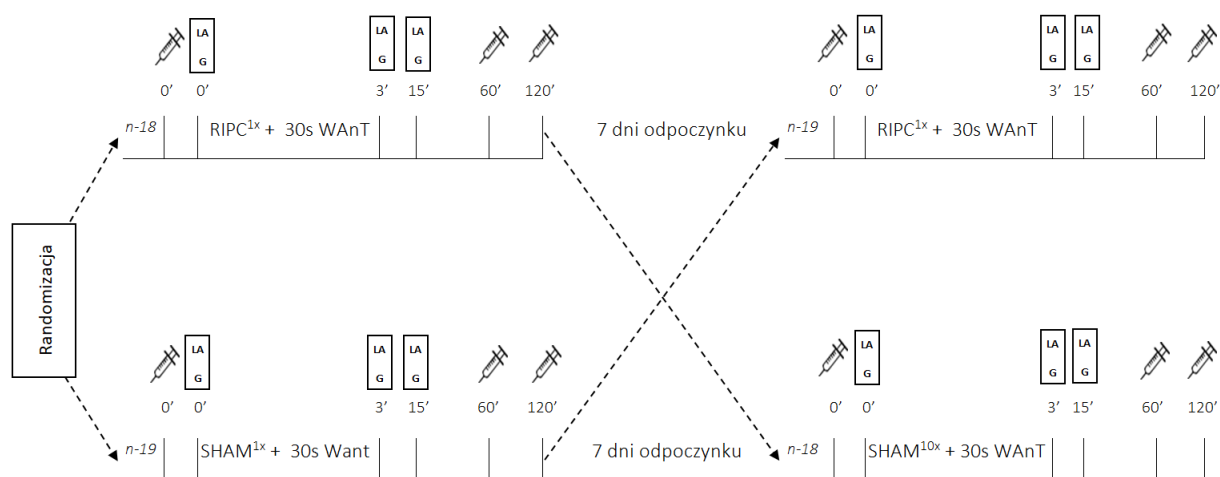
Analiza arkuszy pozwoliła wyeliminować z doboru czynnych i byłych sportowców szczebla krajowego oraz międzynarodowego, jak również osoby mogące podlegać urazom sportowym i pozostałym kryteriom wyłączenia. Następnie wybrani uczestnicy zostali zaznajomieni z protokołem badawczym oraz poinformowani o przebiegu planowanego eksperymentu z wykluczeniem informacji o hipotezach i celach badania, aby wyeliminować wpływ psychologiczny na efekty zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej. Tego samego dnia dokonano pomiaru wysokości ciała oraz oceny składu ciała przy pomocy impedancji bioelektrycznej w godzinach rannych, co najmniej 2 godziny po lekkostrawnym śniadaniu. Wykonano także jednorazowo zdalne hartowanie przez niedokrwienie kończyny dolnej polegające na czterokrotnym ucisku mankietem sfigmomanometru na poziomie 20 mmHg przez 5 minut kończyny dolnej (przeciwnej do dominującej). Przerwy pomiędzy ischemią przeplatane były 5 minutowymi okresami reperfuzji. Następnie wykonano jednorazowe zdalne hartowanie przez niedokrwienie kończyny dolnej na poziomie 220 mmHg. W dalszej części zapoznania uczestników z procedurami badań przeprowadzono próbę maksymalnych możliwości anaerobowych kończyn dolnych Wingate Anaerobic Test z pełnym oporem koła zamachowego.

2.7.2. Drugi etap badań

W drugim etapie badań przeprowadzono eksperyment krzyżowy, w którym losowo przydzielono uczestników do dwóch grup (RIPC i SHAM) o tej samej liczebności (rycina 1). Następnie w godzinach porannych wszystkim badanym osobom pobrano krew w spoczynku na czczo w ilości 20ml do analizy biochemicznej. Po pobraniach krwi pierwsza grupa

badanych (SHAM – grupa placebo) wykonywała jednorazową procedurę zdalnego hartowania przez niedokrwienie polegającą na czterokrotnym ucisku kończyny dolnej za pomocą mankietu do mierzenia ciśnienia dla osób otyłych na poziomie zacisku 20 mmHg przez 5 minut przeplatanych 5 minutowymi okresami reperfuzji. Druga grupa badanych (RIPC) w tym samym czasie wykonała także jednorazową procedurę zdalnego hartowania przez niedokrwienie polegające na czterokrotnym ucisku kończyny dolnej za pomocą mankietu do mierzenia ciśnienia dla osób otyłych, ale na poziomie zacisku 220 mmHg. W grupie RIPC także okresy 5 minutowej ischemii były przeplatane 5 minutowymi okresami reperfuzji. Godzinę od zakończonej jednorazowej procedury zdalnego hartowania przez niedokrwienie w każdej z grup wykonano próbę maksymalnego wysiłku anaerobowego kończyn dolnych za pomocą 30s Wingate Anaerobic Test. Przed wykonaniem testu maksymalnych możliwości anaerobowych każdy z uczestników wykonał 5 minutową rozgrzewkę na ergometrze rowerowym na poziomie 100W. Po zakończeniu WAnT u wszystkich badanych osób zostały pobrane próbki krwi z palca do analizy kwasu mlekowego oraz glukozy w odstępie 3 i 15 minut od wykonanej próby wysiłkowej. Następnie po 60 i 120 minutach od zakończenia WAnT u wszystkich badanych zostały pobrane próbki krwi żyłnej w objętości 10ml do analizy biochemicznej. Siedem dni później powtórzono procedurę badawczą, w której nastąpiła zamiana przydzielonych wcześniej procedur zdalnego hartowania przez niedokrwienie w każdej z grup. Etap ten pozwolił dokonać oceny wpływu jednorazowej procedury zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej niedominującej na poziom:

- stężenia wybranych markerów stanu zapalnego w surowicy krwi,
- maksymalnych możliwości anaerobowych,
- stężenia kwasu mlekowego i glukozy oraz wybranych markerów stanu zapalnego w surowicy krwi indukowanych wysiłkiem anaerobowym.



Rycina 1. Schemat procedury drugiego etapu badań

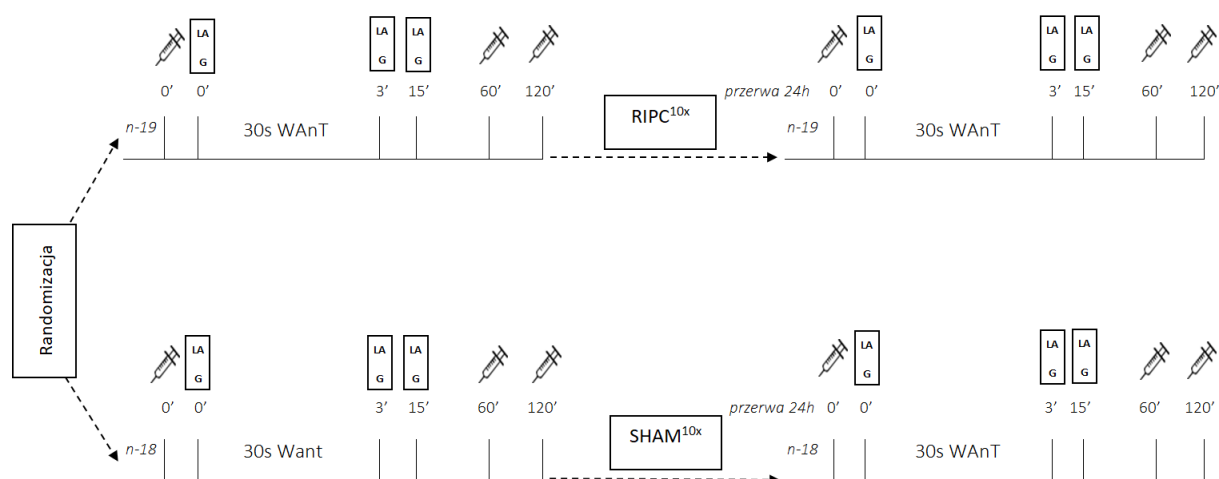
Skróty; LA – kwas mlekowy; G – glukoza, WAnT – Wingate Anerobic Test (test maksymalnej masy anaerobowej); RIPC^{1x} – grupa osób z przeprowadzoną jednorazową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie z doraźnym uciskiem mankietu sfigmomanometru kończy dolnej niedominującej na poziomie 220 mmHg. SHAM^{1x} – grupa osób z przeprowadzoną jednorazową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie z udawanym uciskiem mankietu sfigmomanometru kończyny dolnej niedominującej na poziomie 20 mmHg

2.7.3. Trzeci etap badań

Po upływie 2 tygodni od zakończenia drugiego etapu badań rozpoczęto trzeci etap w formie eksperymentu dwóch równoległych grup podzielonych losowo na RIPC^{10x} oraz SHAM^{10x} (rycina 2). Wszyscy uczestnicy zostali ponownie przebadani pod kątem budowy i składu ciała oraz wykonali 30s test maksymalnego wysiłku anaerobowego poprzedzony 5 minutową rozgrzewką na ergometrze rowerowym na poziomie 100W. Po zakończeniu WAnT u wszystkich badanych osób zostały pobrane próbki krwi z palca do analizy kwasu mlekowego oraz glukozy w odstępie 3 i 15 minut wykonanej próby wysiłkowej. Po 60 i 120 minutach od zakończenia WAnT u wszystkich badanych zostały pobrane próbki krwi żyłnej w objętości 10ml do analizy biochemicznej. W tym etapie badań grupa RIPC^{10x} wykonała przez 10 kolejnych dni procedurę zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej z uciskiem mankietu sfigmomanometru na poziomie 220 mmHg. Grupa SHAM^{10x} (kontrolna) wykonała przez 10 kolejnych dni procedurę RIPC z uciskiem mankietu sfigmomanometru na poziomie 20 mmHg. Dzień po zakończeniu 10 dniowej procedury hartowania przez niedokrwienie przeprowadzono ponownie badanie budowy i składu ciała przy pomocy impedancji bioelektrycznej. Tego dnia we wszystkich grupach badanych została pobrana krew w spoczynku z opuszka palca do analizy kwasu mlekowego i glukozy oraz krew żylna

w ilości 10ml do analiz biochemicznych. Następnie wykonano pomiary maksymalnych możliwości anaerobowych. Przed rozpoczęciem Wingate Testu wszyscy uczestnicy wykonali 5 minutową rozgrzewkę na ergometrze rowerowym na poziomie 100W. Po wykonanym WAnT zostały ponownie pobrane z opuszka palca próbki krwi w odstępach czasu 3 i 15 minut do analizy kwasu mlekowego i glukozy. Po 60 i 120 minutach od zakończenia WAnT została pobrana krew żylna do analizy wybranych markerów stanu zapalnego. Etap ten pozwolił dokonać oceny wpływu 10 dniowej procedury zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej niedominującej na poziom:

- stężenia wybranych markerów stanu zapalnego w surowicy krwi,
- maksymalnych możliwości anaerobowych,
- stężenia kwasu mlekowego i glukozy oraz wybranych markerów stanu zapalnego w surowicy krwi indukowanych wysiłkiem anaerobowym.



Rycina 2. Schemat procedury trzeciego etapu badań

Skróty; LA – kwas mlekowy; G – glukoza, WAnT – Wingate Anerobic Test (test maksymalnej masy anaerobowej); RIPC¹⁰ – grupa osób z przeprowadzoną 10 dniową procedurę zdalnego hartowania przez niedokrwienie z doraźnym uciskiem mankietu sfigmomanometru kończy dolnej niedominującej na poziomie 220 mmHg. SHAM^{10x} – grupa osób z przeprowadzoną 10 dniową procedurę zdalnego hartowania przez niedokrwienie z udawanym uciskiem mankietu sfigmomanometru kończyny dolnej niedominującej na poziomie 20 mmHg

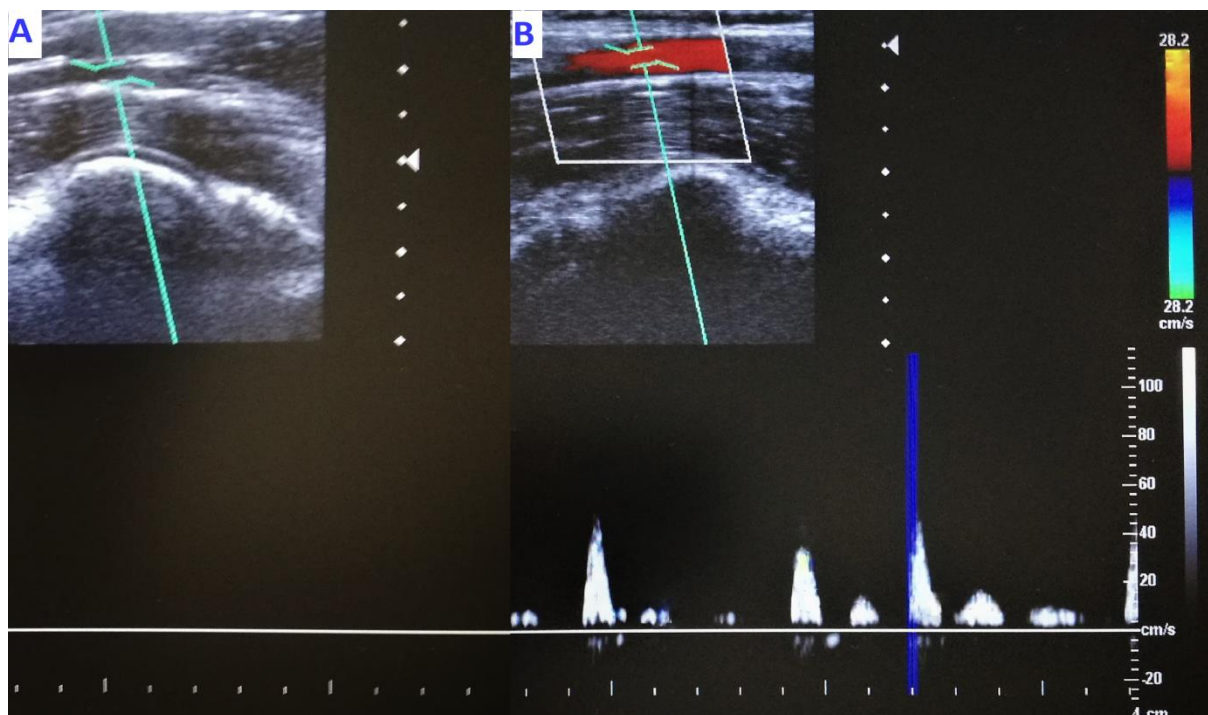
2.7.4. Czwarty etap badań

W ostatnim etapie badań ponownie losowo przydzielono uczestników do dwóch grup (RIPC i SHAM) o tej samej liczebności. W godzinach porannych wszystkim badanym

osobom pobrano krew w spoczynku na czczo w ilości 20ml do analizy biochemicznej. Po pobraniach krwi pierwsza grupa badanych (SHAM) wykonywała jednorazową procedurę zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej polegającą na czterokrotnym ucisku uda za pomocą mankietu do mierzenia ciśnienia dla osób otyłych na poziomie 20 mmHg przez 5 minut przeplatanych 5 minutowymi okresami reperfuzji. Druga grupa badanych (RIPC) w tym samym czasie wykonała także jednorazową procedurę zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej według przyjętej wcześniej procedury na poziomie zacisku uda 220 mmHg. Wszystkim badanym osobom pobrano próbki krwi w odstępach 60 i 120 minut oraz 24 godziny od zakończenia procedury jednorazowego zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej. Etap ten pozwolił dokonać oceny wpływu samego jednorazowego zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej na stężenie wybranych markerów stanu zapalnego w surowicy krwi.

2.8. Protokół zdalnego hartowania przez niedokrwienie (RIPC)

Protokół zdalnego hartowania przez niedokrwienie opierał się na modelu zaproponowanym przez Foster, Giri et al. (2014), według którego zacisk na jednej kończynie dolnej wywołujący niedokrwienie powinien być aplikowany czterokrotnie przez 5 minut z siłą zacisku udowego mankietu sfigmomanometru o wartości przekraczającej 200 mmHg. W grupach SHAM ucisk także został wykonany czterokrotnie przy pomocy udowego mankietu sfigmomanometru do mierzenia ciśnienia na poziomie 20 mmHg, co nie miało wpływu na jakiegokolwiek ograniczenie przepływu krwi w tętnicy udowej (Rycina 3). Pomiędzy aplikacjami zacisku górnej części uda nogi przeciwnej do dominującej, przeprowadzono 5 minutowe etapy przywrócenia krążenia tzw. reperfuzji. Przed rozpoczęciem projektu badawczego protokół zdalnego hartowania przez niedokrwienie został przeprowadzony na 8 ochotnikach, których poddano badaniu ultrasonograficznemu przepływu krwi w tętnicy podkolanowej przez flebologa. Podczas badania protokołu RIPC z głowicą USG Doppler (Edan Instruments GmbH, SonoTrax Basic, Germany) przylegającą w dole podkolanowym zaobserwowano całkowite przerwanie przepływu krwi u wszystkich ochotników (0 cm/s). Z kolei badanie protokołu SHAM wskazywało taką samą prędkość przepływu krwi w tętnicy podkolanowej jak bez użycia mankietu sfigmomanometru (od 42 do 48cm/s w skurczu i od 28 do 30cm/s w rozkurczu serca).



Rycina 3. Zdjęcia USG Doppler (Edan Instruments GmbH, SonoTrax Basic, Germany) przepływu krwi w odcinku tętnicy podkolanowej podczas protokołu zdalnego hartowania przez niedokrwienie z doraźnym uciskiem mankietu sfigmomanometru kończy dolnej niedominującej na poziomie 220 mmHg (A) i udawanym uciskiem mankietu sfigmomanometru kończyny dolnej niedominującej na poziomie 20 mmHg (B).

2.9. Analizy statystyczne

Do analizy wyników zostały uwzględnione podstawowe statystyki opisowe. Normalność rozkładu danych sprawdzono testem Shapiro-Wilka. Do analizy różnic międzygrupowych budowy i składu ciała przed jednorazową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie wykorzystano test t-Studenta dla prób niezależnych. Do analizy budowy i składu ciała przed oraz po 10 dniowej RPC w obu grupach posłużono się dwuczynnikową analizą wariancji z powtarzanym pomiarem (2 grupy x 2 punkty czasowe). Wpływ jednorazowej procedury zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej na poziom maksymalnych możliwości anaerobowych (eksperyment krzyżowy) analizowano za pomocą jednoczynnikowej wariancji powtarzanych pomiarów. W przypadku oceny wpływu dziesięciodniowej procedury RPC na poziom maksymalnych możliwości anaerobowych zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji powtarzanych pomiarów (2 grupy x 2 punkty czasowe). Dwuczynnikową analizę wariancji z powtarzanym (2 grupy x 3 punkty czasowe) wykorzystano do oceny zmian stężenia kwasu mlekowego, glukozy oraz markerów stanu zapalnego we krwi indukowanych 30s testem Wingate zarówno po jednorazowej jak również

przed i po 10 dniowej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie. Dodatkowo w celu zbadania efektu hartowania przez niedokrwienie na wyjściowe stężenia wybranych markerów stanu zapalnego przeprowadzono dwuczynnikową analizę wariancji z powtarzanym pomiarem odpowiednio dla jednorazowej (2 grupy x 4 punkty czasowe) oraz 10 dniowej procedury RIPC (2 grupy x 2 punkty czasowe). W przypadku uzyskania istotnego efektu czynnika głównego lub interakcji czynników w przeprowadzonych analizach wariancji z powtarzanym pomiarem zastosowano test post-hoc Tukeya. Istotność statystyczną wszystkich wykonanych testów została określona na poziomie $\alpha = 0,05$. Wielkości efektów każdego czynnika oraz interakcji obliczono przy użyciu statystyk częściowych eta-kwadrat (η^2) w oparciu o założenie, że wartość równa 0,01 odpowiada małej wielkości efektu; 0,06 umiarkowanej i dużej 0,14 dużej wielkości efektu (Levine and Hullett 2002). Analiza statystyczna została wykonana przy użyciu oprogramowania Statistica 10 (Statsoft Inc. Tulsa, OK, USA).

W celu określenia odpowiedniej wielkości próby w ramach poszczególnych efektów głównych oraz zachodzących pomiędzy nimi interakcji zastosowano oprogramowanie GPower ver. 3.1.9.4 (Franz Faul, Uniwersytet Chrystiana Albrechta w Kilonii, Niemcy). Minimalna całkowita wielkość próbki dla średniej wielkości efektu przy mocy równej 0,8 i poziomie istotności 0,05 wyniosła 24 badanych.

III WYNIKI BADAŃ

W tej sekcji przedstawiono wyniki analiz poszczególnych zmiennych. Jako pierwsza została zaprezentowana w formie tabelarycznej analiza różnic budowy i składu ciała, zarówno przed jednorazową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej, jak również przed i po 10 dniowej procedurze RIPC. Następnie, omówione zostały wyniki maksymalnej wytrzymałości anaerobowej po jednorazowej oraz 10 dniowej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej. W dalszej części przedstawiono zmiany stężenia kwasu mlekowego i glukozy we krwi po jednorazowej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie indukowane maksymalnym wysiłkiem anaerobowym a następnie zaprezentowano analizy zmian stężenia kwasu mlekowego i glukozy we krwi indukowanych maksymalnym wysiłkiem anaerobowym przed i po 10 dniowej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie. w ostatniej części omówiono kolejno zmiany wartości stężenia markerów stanu zapalnego w surowicy:

- 1) indukowanych maksymalnym wysiłkiem anaerobowym,
- 2) wyłącznie jednorazową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie,
- 3) jednorazową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie indukowaną maksymalnym wysiłkiem anaerobowym,
- 4) wyłącznie 10 dniową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie,
- 5) przed i po 10 dniowej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie indukowanych maksymalnym wysiłkiem anaerobowym.

Zmiany maksymalnego wysiłku anaerobowego, stężania mleczanów, glukozy oraz markerów stanu zapalnego w surowicy krwi zostały zaprezentowane w zbiorczych wykresach zawierających wartości średnie oraz odchylenia standardowe w obu grupach. z kolei wartości efektów głównych oraz interakcji między nimi dla każdej zmiennej zostały przedstawione w tabelach.

3.1. Analiza budowy i składu ciała

3.1.1. Charakterystyka budowy i składu ciała przed jednorazową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej

Analiza testu t studenta badanych wskaźników budowy i składu ciała nie wykazała istotnych różnic pomiędzy grupami przed jednorazową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej (Tabela 1).

Tabela 1. Wyniki analizy budowy i składu ciała przed jednorazową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej

Zmienna	J.m.	RIPC _{1x}	SHAM _{1x}	P
Wysokość ciała	[cm]	180,31 ± 4,37	181,30 ± 4,77	0.55
Masa Ciała	[kg]	75,15 ± 8,41	78,79 ± 8,66	0.13
BMI	[kg/m ²]	23,11 ± 2,38	23,96 ± 2,37	0.17
Całkowita masa mięśni szkieletowych	[kg]	37,74 ± 2,98	39,83 ± 3,91	0.07
Całkowita masa tłuszczowa	[kg]	9,22 ± 5,22	9,45 ± 5,15	0.87
Procentowa zawartość masy tłuszczowej	[% MC]	11,87 ± 5,11	11,72 ± 5,53	0.97

Skróty: J.M., jednostka miary; RIPC_{1x} grupa z przeprowadzoną jednorazową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej z uciskiem mankietu sfigmomanometru na poziomie 220 mmHg (RIPC); SHAM_{1x}, grupa z przeprowadzoną jednorazową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej z uciskiem mankietu sfigmomanometru na poziomie 20 mmHg; BMI, body mass index (wskaźnik masy ciała); MC, masa ciała

3.1.2. Charakterystyka budowy i składu ciała przed oraz po 10 dniowej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej

Wyniki dwuczynnikowej wariancji wskaźników budowy i składu ciała nie wykazały w badanych grupach istotnych różnic zarówno przed jak i po 10 dniowej procedurze hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej (Tabela 2).

Tabela 2. Wartości średnie i odchylenia standardowe wyników budowy oraz składu ciała przed i po 10 dniowej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej

Zmienna	J.m.	RPC _{10x}			SHAM _{10x}		
		Przed	Po	P	Przed	Po	P
Masa Ciała	[kg]	75,52 ± 7,51	75,01 ± 7,70	0.53	79,18 ± 8,99	79,03 ± 8,71	0.89
BMI	[kg/m ²]	23,11 ± 2,38	22,95 ± 2,19	0.48	23,96 ± 2,37	24,19 ± 2,36	0.81
Całkowita masa mięśni szkieletowych	[kg]	37,65 ± 2,26	37,56 ± 2,78	0.90	39,20 ± 3,97	39,48 ± 4,28	0.87
Całkowita masa tłuszczowa	[kg]	9,77 ± 5,97	9,44 ± 5,65	0.28	10,75 ± 4,77	10,40 ± 4,58	0.21
Procentowa zawartość masy tłuszczowej	[% MC]	12,48 ± 5,97	12,18 ± 5,92	0.42	13,33 ± 4,97	12,94 ± 5,06	0.16

Skróty: J.M., jednostka miary; RPC_{1x} grupa z przeprowadzoną jednorazową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej z uciskiem mankietu sfigmomanometru na poziomie 220 mmHg (RPC); SHAM_{1x}, grupa przeprowadzoną jednorazową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej z uciskiem mankietu sfigmomanometru na poziomie 20 mmHg; BMI, body mass index (wskaźnik masy ciała); MC, masa ciała

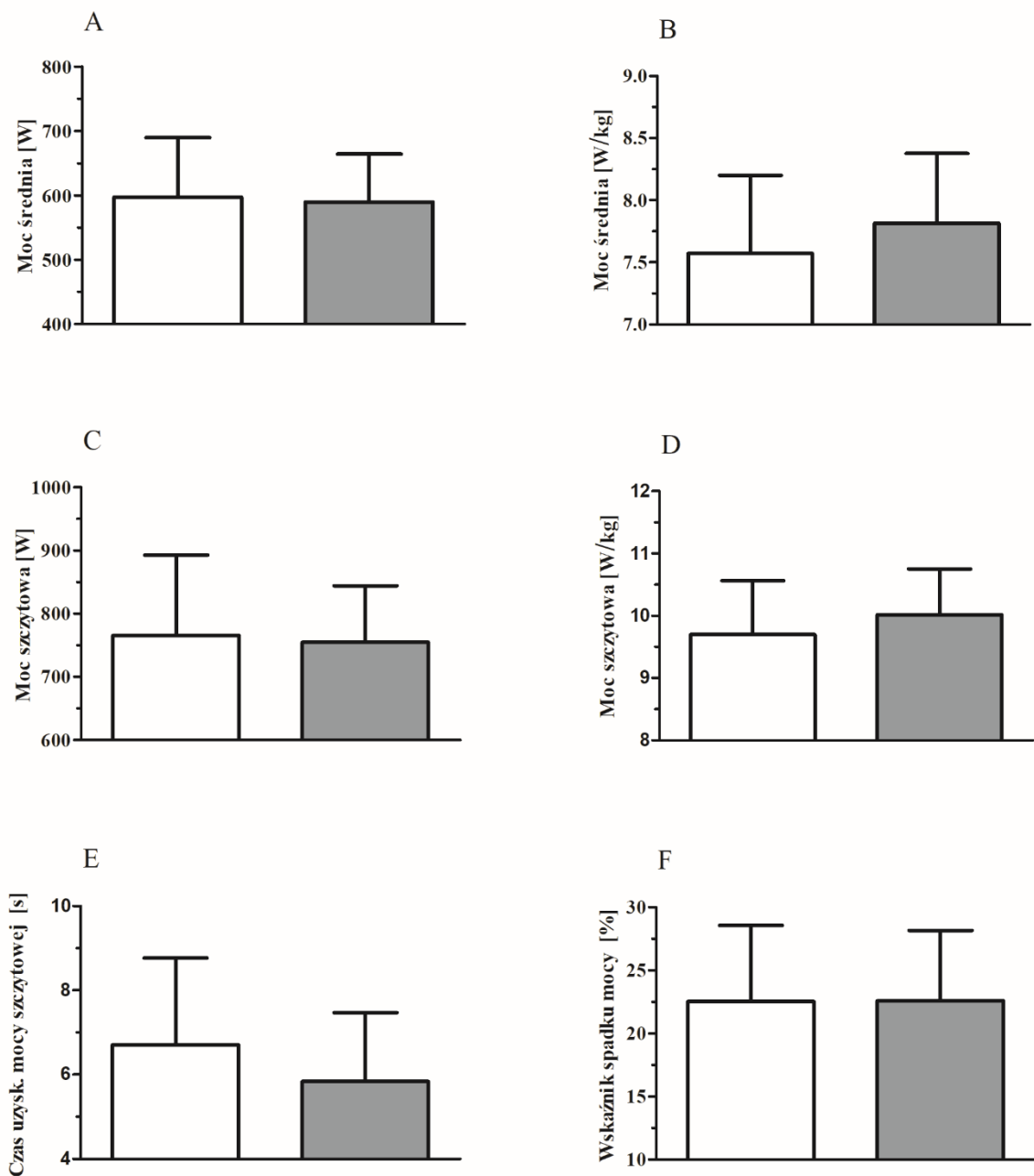
3.2. Analiza poziomu maksymalnych możliwości anaerobowych

3.2.1. Wpływ jednorazowej procedury zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej na poziom maksymalnych możliwości anaerobowych

Analiza wariancji wyników 30s testu Wingate po jednorazowej procedurze hartowania przez niedokrwienie nie wykazała istotnych różnic pomiędzy grupami (Tabela 3). Mimo tego faktu na uwagę zasługują wyniki czasu osiągnięcia mocy szczytowej w grupie $RIPC_{1x}$, których średnie wartości w porównaniu do $SHAM_{1x}$ były o 0,87s krótsze (Rycina 4). Siła efektu tego wskaźnika była na poziomie umiarkowanym.

Tabela 3. Jednoczynnikowa analiza wariancji wyników 30s Wingate testu po jednorazowej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej

Zmienna	Efekt	F (stopnie swobody)	P	Wielkość efektu (η^2)
Bezwzględna wartość mocy średniej	Grupa	0,06 (1, 35)	0,8	< 0,01
Moc średnia znormalizowana do masy ciała	Grupa	1,26 (1, 35)	0,26	0,03
Bezwzględna wartość mocy szczytowej	Grupa	0,07 (1, 35)	0,79	< 0,01
Moc szczytowa znormalizowana do masy ciała	Grupa	1,19 (1, 35)	0,28	0,03
Czas uzyskania mocy szczytowej	Grupa	1,76 (1, 35)	0,17	0,06
Wskaźnik spadku mocy	Grupa	0,04 (1, 35)	0,82	< 0,01



Rycina 4. Wyniki 30s Wingate test po jednorazowej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej (wartości średnie i odchylenia standardowe).

Znaczniki: Białe słupki dotyczą grupy z przeprowadzoną jednorazową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej z uciskiem mankietu sfingonanometrycznego na poziomie 20 mmHg (SHAM_{1x}). Szare słupki dotyczą grupy z przeprowadzoną jednorazową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej z uciskiem mankietu sfingonanometrycznego na poziomie 220 mmHg (RIPC_{1x}). A, bezwzględna wartość mocy średniej; B, wartość mocy średniej znormalizowanej do masy ciała; C, bezwzględna wartość mocy szczytowej; D, bezwzględna wartość mocy szczytowej znormalizowanej do masy ciała; E, czas uzyskania mocy szczytowej; F, wskaźnik spadku mocy

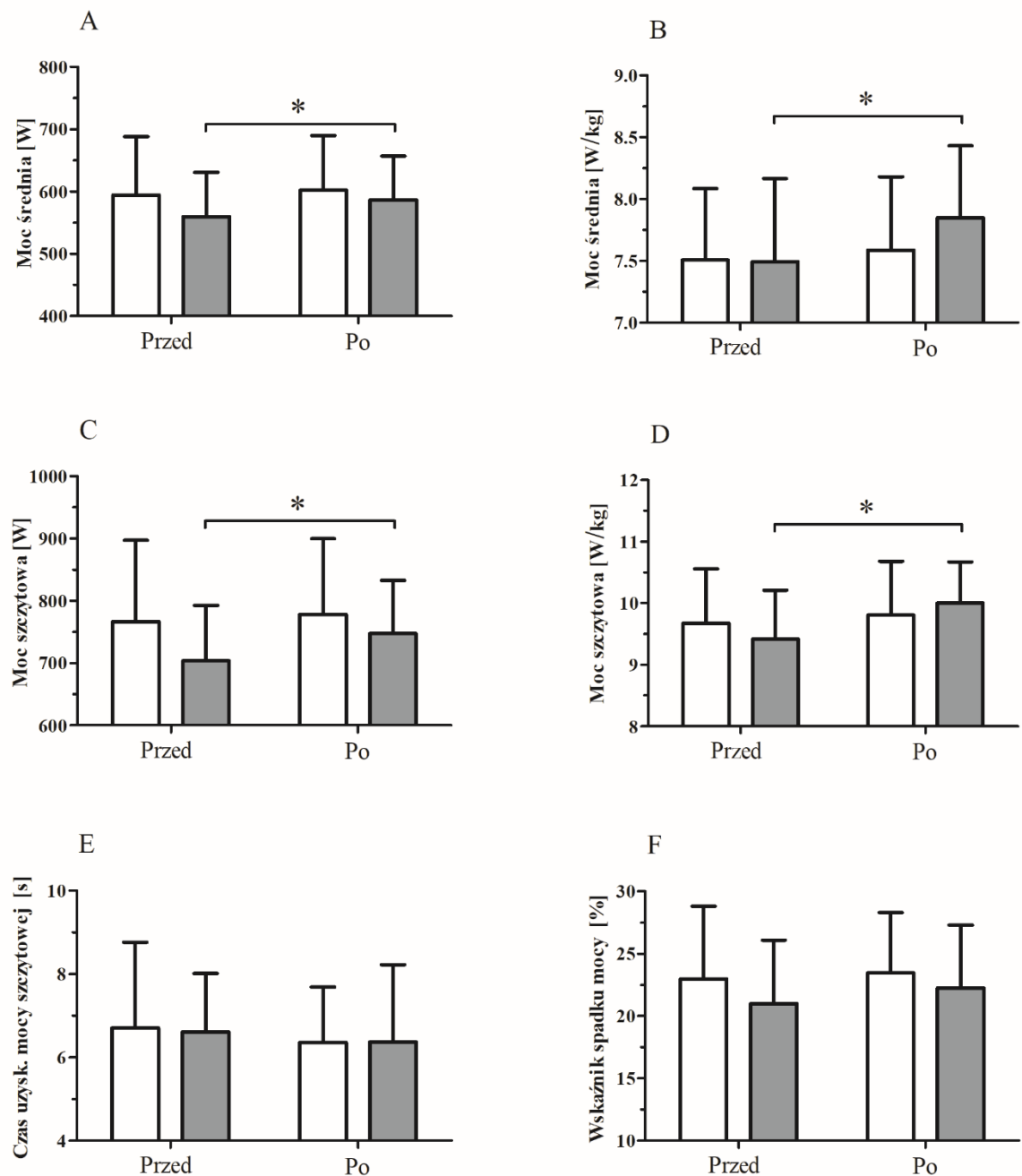
3.2.2. Wpływ 10 dniowej procedury zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej na poziom maksymalnych możliwości anaerobowych

Analiza wariancji wyników 30s Wingate testu wykazała istotny efekt 10 dniowej procedury zdalnego hartowania przez niedokrwienie w grupie stosującej ucisk mankietu sfigmomanometru na poziomie 220 mmHg (Tabela 4). W wyniku zakończonego eksperymentu w grupie $RIPC_{10x}$ zaobserwowano 4,81% ($p < 0,05$) wzrost bezwzględnych wartości mocy średniej i 6,25% ($p < 0,05$) mocy maksymalnej, jak również 4,79% ($p < 0,05$) wzrost znormalizowanych do masy ciała wartości mocy średniej i 6,38% ($p < 0,05$) mocy maksymalnej. W grupie $SHAM_{10x}$ wyniki maksymalnych możliwości anaerobowych po 10 dniach pozorowanej procedury zdalnego hartowania przez niedokrwienie pozostały na podobnym poziomie względem wartości wyjściowych (Rycina 5).

Tabela 4. Dwuczynnikowa analiza wariancji z powtarzanym pomiarem (2 grupy x 2 punkty czasowe) wyników 30s Wingate testu przed i po 10 dniowej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej.

Zmienna	Efekt	F (stopnie swobody)	P	Wielkość efektu (η^2)	Post-hoc
Bewzględna wartość mocy średniej	Grupa	0,87 (1, 35)	0,35	0,02	
	WAnT	19,89 (1, 35)	< 0,01	0,36	Przed < Po
	Grupa x WAnT	6,28 (1, 35)	0,01	0,15	Przed $RIPC_{10x}$ < Po $RIPC_{10x}$
Moc średnia znormalizowana do masy ciała	Grupa	0,42 (1, 35)	0,52	0,01	
	WAnT	16,38 (1, 35)	< 0,01	0,31	Przed < Po
	Grupa x WAnT	6,53 (1, 35)	0,01	0,16	Przed $RIPC_{10x}$ < Po $RIPC_{10x}$
Bewzględna wartość mocy szczytowej	Grupa	1,78 (1, 35)	0,18	0,04	
	WAnT	16,51(1, 35)	< 0,01	0,32	Przed < Po
	Grupa x WAnT	5,38 (1, 35)	0,02	0,13	Przed $RIPC_{10x}$ < Po $RIPC_{10x}$
Moc szczytowa znormalizowana do masy ciała	Grupa	0,01 (1, 35)	0,90	< 0,01	
	WAnT	14,45 (1, 35)	< 0,01	0,29	Przed < Po
	Grupa x WAnT	5,86 (1, 35)	0,02	0,14	Przed $RIPC_{10x}$ < Po $RIPC_{10x}$
Czas uzyskania mocy szczytowej	Grupa	0,01 (1, 35)	0,92	<0,01	
	WAnT	1,06 (1, 35)	0,30	0,02	
	Grupa x WAnT	0,03 (1, 35)	0,85	<0,01	
Wskaźnik spadku mocy	Grupa	1,01 (1, 35)	0,31	0,02	
	WAnT	1,47 (1, 35)	0,23	0,04	
	Grupa x WAnT	0,30 (1, 35)	0,58	0,01	

Skróty: WAnT- Wingate Anaerobic Test; $RIPC_{10x}$ - grupa osób z przeprowadzoną 10 dniową procedurą hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej z uciskiem mankietu sfigmomanometru na poziomie 220mmHg.



Rycina 5. Wyniki jednorazowego 30s Wingate testu przed i po 10 dniowym zdalnym hartowaniu przez niedokrwienie kończyny dolnej (wartości średnie i odchylenia standardowe).

*Znaczniki: Białe słupki dotyczą grupy z przeprowadzoną 10 dniową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej z uciskiem mankietu sfigmomanometru na poziomie 20 mmHg (SHAM_{10x}). Szare słupki dotyczą grupy z przeprowadzoną 10 dniową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyn dolnej z uciskiem mankietu sfigmomanometru na poziomie 220 mmHg (RIPC_{10x}). A, bezwzględna wartość mocy średniej; B, wartość mocy średniej znormalizowanej do masy ciała; C, bezwzględna wartość mocy szczytowej; D, bezwzględna wartość mocy szczytowej znormalizowanej do masy ciała; E, czas uzyskania mocy szczytowej; F, wskaźnik spadku mocy; *istotna różnica na poziomie $p < 0.01$.*

3.3. Analiza stężenia kwasu mlekowego i glukozy we krwi

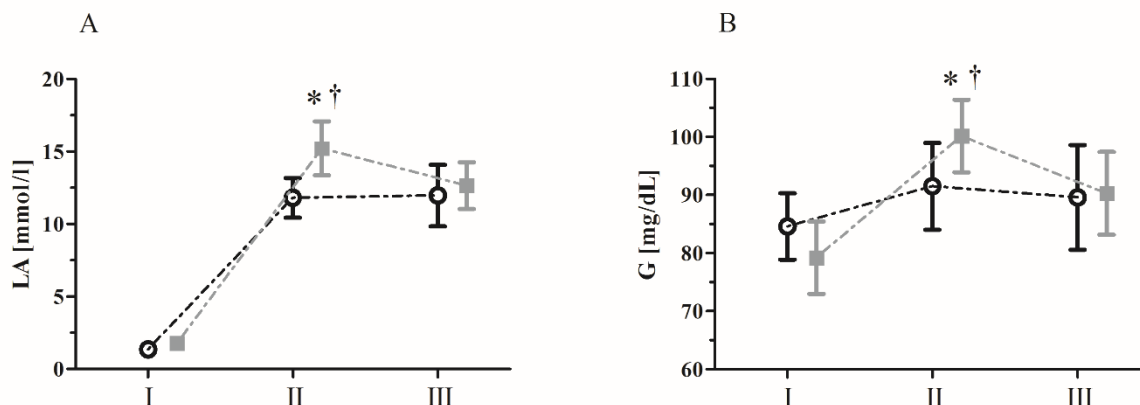
3.3.1. Wpływ jednorazowej procedury zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej na zamiany stężenia kwasu mlekowego i glukozy we krwi indukowanych maksymalnym wysiłkiem anaerobowym

Analiza wariancji stężenia kwasu mlekowego i glukozy we krwi indukowanego maksymalnym wysiłkiem anaerobowym po jednorazowej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie, podobnie jak przed eksperymentem, wykazała istotny efekt czynnika stanowiącego 30s Wingate test (Tabela 5). Jednakże oprócz istotnego wzrostu stężenia kwasu mlekowego oraz glukozy we krwi 2min (LA, 762,78%; G, 15,69%) i 15min (LA, 709,93%; G, 9,55%) po wysiłku, zauważono, że średnie wartości obu markerów 3min po wysiłku były istotnie wyższe względem pozostałych poborów. Istotna interakcja czynnika grupowego i 30s Wingate test wykazała w grupie $RIPC_{1x}$ o 22,80% ($p < 0,05$) wyższy poziom stężenia kwasu mlekowego i 8,98% ($p < 0,05$) wyższy poziom stężenia glukozy we krwi 3min po wysiłku w porównaniu do $SHAM_{1x}$ (Rycina 6).

Tabela 5. Dwuczynnikowa analiza wariancji z powtarzanym pomiarem (2 grupy x 3 punkty czasowe) stężenia kwasu mlekowego i glukozy we krwi po jednorazowej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej indukowanego 30s Wingate testem

Zmienna	Efekt	F (stopnie swobody)	P	Wielkość efektu (η^2)	Post-hoc
LA	Grupa	1541 (1, 35)	< 0,01	0,33	$RIPC_{1x} > SHAM_{1x}$
	WAnT	787,38 (1, 35)	< 0,01	0,96	I < II, III; II > III
	Grupa x WAnT	10,22 (2, 70)	< 0,01	0,24	I- $RIPC_{1x}$ < II, III- $RIPC_{1x}$ II- $RIPC_{1x}$ > III- $RIPC_{1x}$ I- $SHAM_{1x}$ < II, III- $SHAM_{1x}$ II- $RIPC_{1x}$ > II- $SHAM_{1x}$
G	Grupa	0,41 (1, 35)	0,52	0,01	
	WAnT	43,21 (1, 35)	< 0,01	0,59	I < II, III; II > III
	Grupa x WAnT	10,54 (2, 70)	< 0,01	0,26	I- $RIPC_{1x}$ < II, III- $RIPC_{1x}$ II- $RIPC_{1x}$ > III- $RIPC_{1x}$ I- $SHAM_{1x}$ < II, III- $SHAM_{1x}$ II- $RIPC_{1x}$ > II- $SHAM_{1x}$

Skróty: LA – kwas mlekowy; G – glukoza; WAnT –Wingate Anaerobic Test; I –pobór krwi spoczynkowej; II – pobór krwi 3 min po wysiłku; III – pobór krwi 15 min po wysiłku; SHAM_{1x}, grupa osób z przeprowadzoną jednorazową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej z uciskiem mankietu sfigmomanometru hartowania przez niedokrwienie kończy dolnej z uciskiem mankietu sfigmomanometru na poziomie 220 mmHg.



Rycina 6. Stężenie kwasu mlekowego i glukozy we krwi po jednorazowej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej indukowane 30s Wingate testem (wartości średnie i odchylenia standardowe).

Skróty: A – kwas mlekowy (LA); B – glukoza (G); I – pobór krwi w stanie spoczynkowym; II – pobór krwi 3 min po wysiłku; III – pobór krwi 15 min po wysiłku;

Znaczniki: Białe kółka połączone przerywaną linią dotyczą grupy osób z przeprowadzoną 10 dniową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej z uciskiem mankietu sfigmomanometru na poziomie 20 mmHg (SHAM_{1x}). Szare kwadraty połączone przerywaną linią dotyczą grupy osób z przeprowadzoną 10 dniową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej z uciskiem mankietu sfigmomanometru na poziomie 220 mmHg (RIPC_{1x});

*istotna różnica pomiędzy grupami na poziomie $p < 0.01$; † istotna różnica pomiędzy poborem krwi 120 min po wysiłku na poziomie $p < 0.01$

Analiza testów post hoc wykazała również, że tylko w grupie RIPC_{1x} zaobserwowano spadek stężenia kwasu mlekowego o 15,10 % ($p < 0,05$) i glukozy o 9,88 % ($p < 0,05$) pomiędzy drugim (3min po 30s Wingate test) i trzecim poborem krwi (15min po 30s Wingate test). W grupie SHAM_{1x} stężenia kwasu mlekowego i glukozy zanotowane 3min i 5min po maksymalnym wysiłku anaerobowym utrzymywały się na podobnym poziomie.

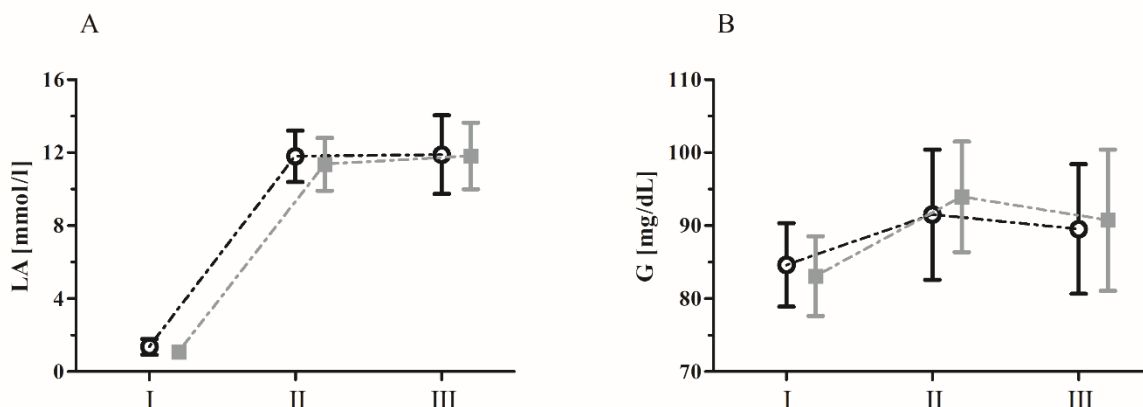
3.3.2. Wpływ maksymalnego wysiłku anaerobowego na zamiany stężenia kwasu mlekowego i glukozy przed 10 dniową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej

W wyniku analizy wariancji stężenia kwasu mlekowego i glukozy we krwi wykazano istotny efekt czynnika stanowiącego 30s Wingate test (Tabela 6). Niezależnie od podziału grupowego istotny wzrost stężenia kwasu mlekowego i glukozy zaobserwowano w poborze krwi 3min i 15min po wysiłku względem wartości wyjściowych (Rycina 7). Dla zaobserwowanych zmian stężenia kwasu mlekowego we krwi w obu grupach, największy wzrost zanotowano 15min po wysiłku (871,2 %; $p < 0,05$). Z kolei największe zmiany stężenia glukozy zanotowano w drugim poborze krwi 3min po 30s Wingate teście. Uśredniona wartość stężenia glukozy we krwi dla obu grup wzrosła o 10,55% ($p < 0,05$).

Tabela 6. Dwuczynnikowa analiza wariancji z powtarzanym pomiarem (2 grupy x 3 punkty czasowe) stężenia kwasu mlekowego i glukozy we krwi indukowanego 30 s Wingate testem przed 10 dniową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej

Zmienna	Efekt	F (stopnie swobody)	P	Wielkość efektu (η^2)	Post-hoc
LA	Grupa	0,61 (1, 35)	0,44	0,01	I < II, III
	WAnT	875,14 (1, 35)	< 0,01	0,96	
	Grupa x WAnT	0,21 (2, 70)	0,81	< 0,01	
G	Grupa	0,11 (1, 35)	0,52	0,01	I < II, III
	WAnT	24,77 (1, 35)	< 0,01	0,41	
	Grupa x WAnT	1,22 (2, 70)	0,29	0,03	

Skróty: LA – kwas mlekowy; G – glukoza; WAnT –Wingate Anaerobic Test; I –pobór krwi spoczynkowej; II – pobór krwi 3 min po wysiłku; III – pobór krwi 15 min po wysiłku



Rycina 7. Stężenia kwasu mlekowego oraz glukozy we krwi indukowanego 30s Wingate testem przed 10 dniową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej (wartości średnie i odchylenia standardowe).

Skróty : A – kwas mlekowy (LA); B – glukoza (G); ; I –pobór krwi spoczynkowej II – pobór krwi 3 min po wysiłku; III – pobór krwi 15 min po wysiłku; Znaczniki: Białe kółka połączone przerywaną linią dotyczą grupy osób z przeprowadzoną 10 dniową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej z uciskiem mankietu sfigmomanometru na poziomie 20 mmHg (SHAM_{10x}). Szare kwadraty połączone przerywaną linią dotyczą grupy osób z przeprowadzoną 10 dniową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej z uciskiem mankietu sfigmomanometru niedominującej na poziomie 220 mmHg (RIPC_{10x})

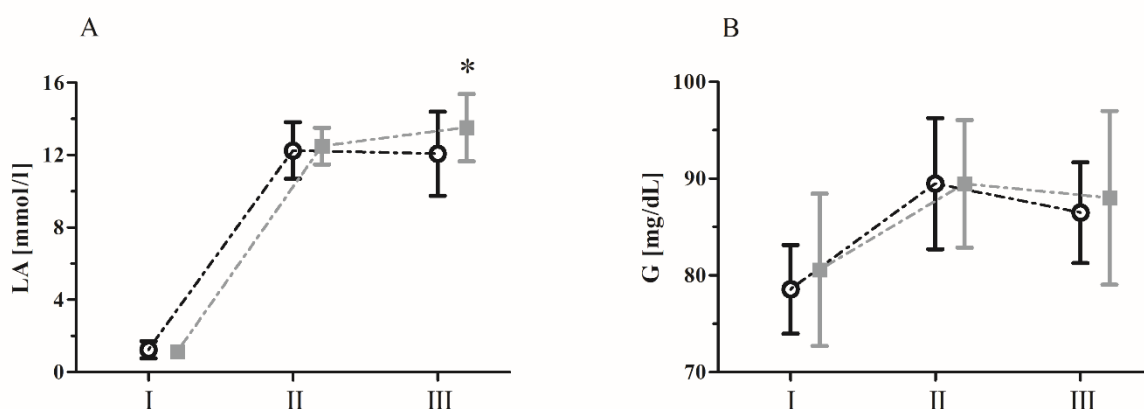
3.3.3. Wpływ 10 dniowej procedury zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej na zamiany stężenia kwasu mlekowego i glukozy we krwi indukowanych maksymalnym wysiłkiem anaerobowym

Po 10 dniowej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej analiza wariancji stężenia kwasu mlekowego i glukozy we krwi indukowanego maksymalnym wysiłkiem anaerobowym także wykazała istotny efekt czynnika stanowiącego 30s Wingate test (Tabela 7). Niezależnie od podziału grupowego istotny wzrost stężenia kwasu mlekowego we krwi zaobserwowano 3min po (939,49%) i 15min po maksymalnym wysiłku anaerobowym (973,94%) względem wartości wyjściowych. W przypadku glukozy jej stężenie wzrosło o 12,48% ($p < 0,05$) 3min po i 9,65 % 15min po 30s Wingate test względem wartości wyjściowych. W przeprowadzonej analizie wariancji zanotowano również istotną interakcję czynnika grupowego i 30s Wingate test dla stężania kwasu mlekowego we krwi. Testy post hoc wykazały w grupie RIPC_{10x} o 12,08% ($p < 0,05$) wyższe wyniki LA 15min po wysiłku w porównaniu do SHAM_{10x} (Rycina 8). W przypadku zamian stężenia glukozy po 10 dniowej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie indukowanych maksymalnym wysiłkiem anaerobowym nie zanotowano istotnych różnic pomiędzy grupami.

Tabela 7. Dwuczynnikowa analiza wariancji z powtarzanym pomiarem (2 grupy x 3 punkty poboru) wyników stężenia kwasu mlekowego i glukozy we krwi po 10 dniowej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej indukowanej 30s testem Wingate

Zmienna	Efekt	F (stopnie swobody)	P	Wielkość efektu (η^2)	Post-hoc
LA	Grupa	212 (1, 35)	0,44	0,01	
	WAnT	1601,29 (1, 35)	< 0,01	0,97	I < II, III
	Grupa x WAnT	4,54 (1, 35)	0,01	0,11	III-RIPC _{10x} > III-SHAM _{10x}
G	Grupa	0,11 (1, 35)	0,52	0,01	
	WAnT	24,77 (1, 35)	< 0,01	0,41	I < II, III;
	Grupa x WAnT	1,22 (1, 35)	0,29	0,03	

Skróty: LA – kwas mlekowy; G – glukoza; WAnT –Wingate Anaerobic Test; I –pobór krwi w stanie spoczynkowym; II – pobór krwi 2 min po wysiłku; III – pobór krwi 15 min po wysiłku; SHAM_{10x}, grupa osób z przeprowadzoną 10 dniową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej z uciskiem mankietu sfigmomanometru na poziomie 20 mmHg; RIPC_{10x}, grupa osób z przeprowadzoną 10 dniową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończy dolnej z uciskiem mankietu sfigmomanometru na poziomie 220 mmHg.



Rycina 8. Stężenia kwasu mlekowego i glukozy po 10 dniowej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej indukowanej 30s testem Wingate (wartości średnie i odchylenia standardowe).

Skróty: A– kwas mlekowy (LA); B – glukoza (G); I –pobór krwi w stanie spoczynkowym; II – pobór krwi 3 min po wysiłku; III – pobór krwi 15 min po wysiłku.

Znaczniki: Białe kółka połączone przerywaną linią dotyczą grupy osób z przeprowadzoną 10 dniową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej z uciskiem mankietu sfigmomanometru na poziomie 20 mmHg (SHAM_{10x}). Szare kwadraty połączone przerywaną linią dotyczą grupy osób z przeprowadzoną 10 dniową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończy dolnej z uciskiem mankietu sfigmomanometru na poziomie 220 mmHg (RIPC_{10x})

**istotna różnica pomiędzy grupami na poziomie $p < 0.01$*

3.4. Analiza stężenia markerów stanu zapalnego

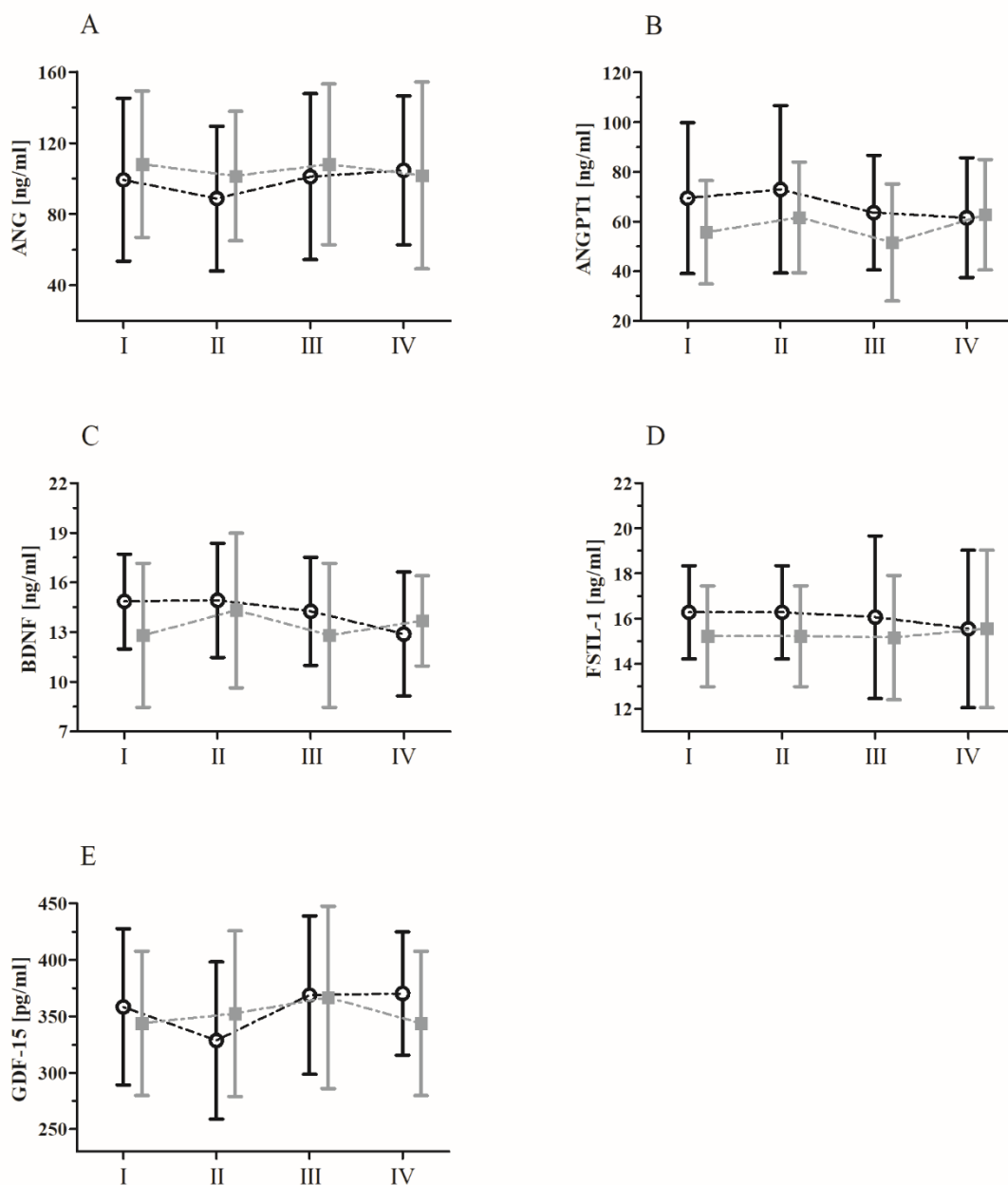
3.4.1. Wpływ jednorazowej procedury zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej na zmiany stężenia wyjściowego markerów stanu zapalnego we krwi

Analiza wariancji wyników stężenia markerów stanu zapalnego zaprezentowano w Tabeli 8. Wyniki badań nie wykazały istotnych efektów po jednorazowej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej. Poziom stężenia badanych markerów stanu zapalnego we wszystkich poborach krwi po wykonaniu jednorazowej procedury zdalnego hartowania przez niedokrwienie ukształtował się na zbliżonym poziomie w obu grupach (Rycina 9a i 9b).

Tabela 8. Dwuczynnikowa analiza wariancji z powtarzanym pomiarem (2 grupy x 4 punkty czasowe) stężenia wyjściowego markerów stanu zapalnego po jednorazowej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej

Zmienna	Efekt	F (stopnie swobody)	P	Wielkość efektu (η^2)
ANG	Grupa	0,35 (1, 35)	0,55	0,02
	P-RIPC _{1x}	0,33 (1, 35)	0,78	0,02
	Grupa x P-RIPC _{1x}	0,20 (2, 70)	0,89	0,01
ANGTP1	Grupa	1,23 (1, 35)	0,27	0,05
	P-RIPC _{1x}	0,90 (1, 35)	0,44	0,03
	Grupa x P-RIPC _{1x}	0,66 (2, 70)	0,57	0,02
BDNF	Grupa	0,88 (1, 35)	0,35	0,04
	P-RIPC _{1x}	0,64 (1, 35)	0,58	0,02
	Grupa x P-RIPC _{1x}	0,73 (2, 70)	0,53	0,03
FSTL-1	Grupa	1,37 (1, 35)	0,25	0,06
	P-RIPC _{1x}	0,29 (1, 35)	0,82	0,01
	Grupa x P-RIPC _{1x}	0,16 (2, 70)	0,91	0,01
GDF-15	Grupa	0,04 (1, 35)	0,83	< 0,01
	P-RIPC _{1x}	0,83 (1, 35)	0,47	0,03
	Grupa x P-RIPC _{1x}	0,74 (2, 70)	0,52	0,03
IL-6	Grupa	0,34 (1, 35)	0,56	0,01
	P-RIPC _{1x}	0,43 (1, 35)	0,72	0,02
	Grupa x P-RIPC _{1x}	0,72 (2, 70)	0,53	0,03
IL-10	Grupa	0,01 (1, 35)	0,98	< 0,01
	P-RIPC _{1x}	0,65 (1, 35)	0,65	0,02
	Grupa x P-RIPC _{1x}	0,41 (2, 70)	0,74	0,01
IL-15	Grupa	1,45 (1, 35)	0,24	0,06
	P-RIPC _{1x}	1,66 (1, 35)	0,18	0,07
	Grupa x P-RIPC _{1x}	0,14 (2, 70)	0,93	< 0,01
LIF	Grupa	0,10 (1, 35)	0,74	0,01
	P-RIPC _{1x}	0,89 (1, 35)	0,45	0,04
	Grupa x P-RIPC _{1x}	1,31 (2, 70)	0,27	0,06
OSM	Grupa	0,29 (1, 35)	0,59	0,01
	P-RIPC _{1x}	0,60 (1, 35)	0,61	0,02
	Grupa x P-RIPC _{1x}	0,87 (2, 70)	0,45	0,03
TIMP-1	Grupa	0,55 (1, 35)	0,46	0,03
	P-RIPC _{1x}	0,46 (1, 35)	0,70	0,02
	Grupa x P-RIPC _{1x}	0,42 (2, 70)	0,73	0,01

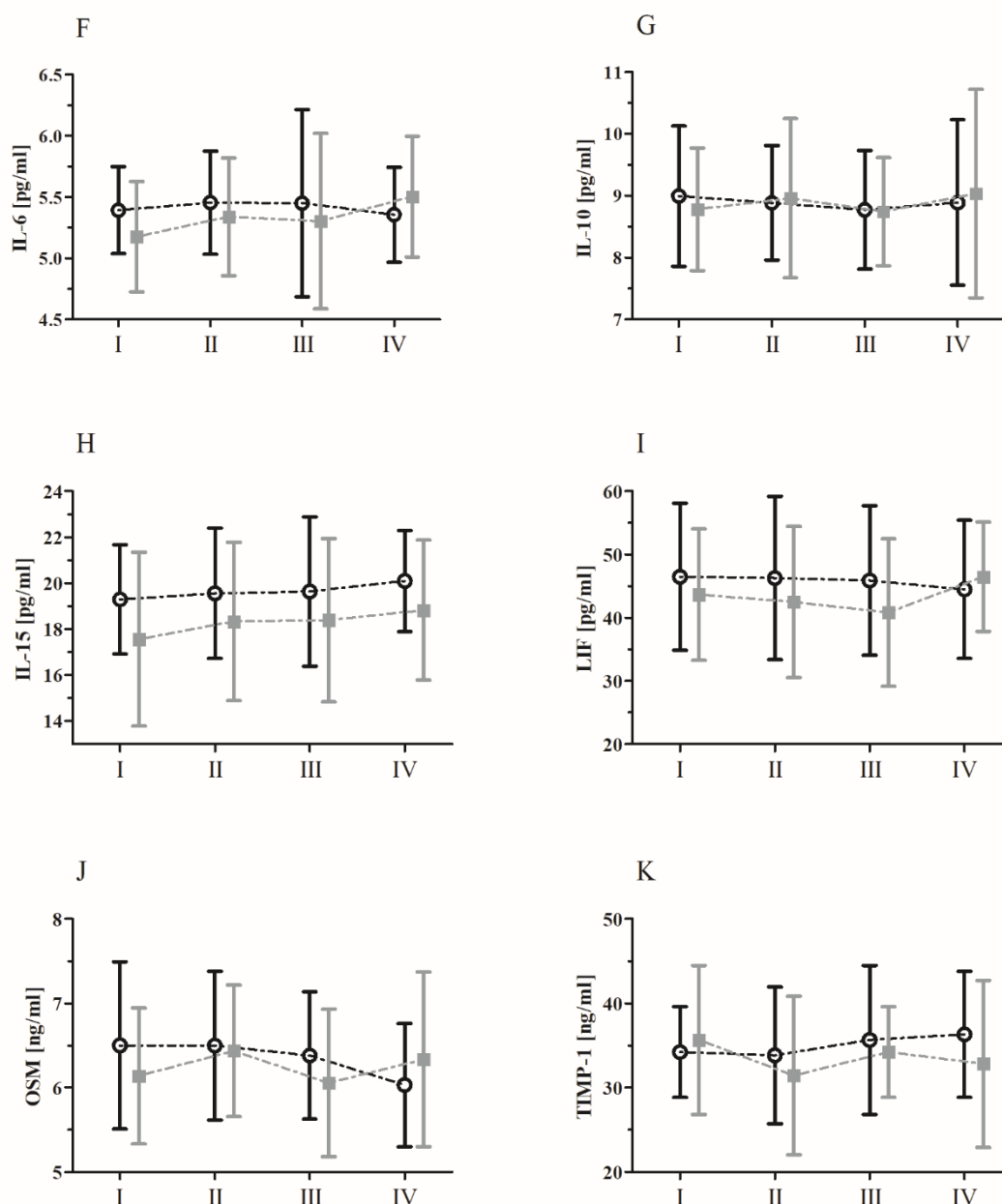
Skróty; ANG – angiogenia; ANGPT1- angiopoetyna; BDNF -neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego; FSTL-1 – folistatyna; GDF-15 – różnicujący czynnik wzrostu; IL-6 – interleukina 6; IL-10 – interleukina 10 IL15 – interleukina 15; LIF – czynnik hamujący białaczkę; OSM – onkostatyna m; TIMP-1 inhibitor metaloproteinaz1; P-RIPC_{1x} – jednorazowa procedura zdalnego hartowania przez niedokrwienie



Rycina 9a. Stężenie wyjściowe markerów stanu zapalnego we krwi po jednorazowej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej (wartości średnie i odchylenie standardowe)

Skróty: ANG – angiogenina (A); ANGPT1- angiopoetyna (B); BDNF -neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego (C); FSTL-1 – folistatyna (D); GDF-15 – różnicujący czynnik wzrostu (E). I – pobór krwi w stanie spoczynkowym; II – pobór krwi 60 min po; III – pobór krwi 120 po; VIII - pobór krwi 24h po jednorazowej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie.

Znaczniki: Białe kółka połączone przerywaną linią dotyczą grupy osób z przeprowadzoną jednorazową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej z uciskiem mankieta sfigmomanometru na poziomie 20 mmHg (SHAM_{1x}). Szare kwadraty połączone przerywaną linią dotyczą grupy osób z przeprowadzoną jednorazową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej z uciskiem mankieta sfigmomanometru na poziomie 220 mmHg (RIPC_{1x})



Rycina 9b. Stężenie wyjściowe markerów stanu zapalnego we krwi po jednorazowej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej (wartości średnie i odchylenie standardowe)

Skróty: IL-6 – interleukina 6 (F); IL-10 – interleukina 10 (G); IL-15 – interleukina 15 (H); LIF – czynnik hamujący białaczkę (I); OSM – onkostatyna m (J); TIMP-1 inhibitor metaloproteinaz 1 (K); I –pobór krwi w stanie spoczynkowym; II – pobór krwi 60 min po; III – pobór krwi 120 po; VIII - pobór krwi 24h po jednorazowej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie.

Znaczniki: Białe kółka połączone przerywaną linią dotyczą grupy osób z przeprowadzoną jednorazową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej z uciskiem mankietu sfigmomanometru na poziomie 20 mmHg (SHAM_{1x}). Szare kwadraty połączone przerywaną linią dotyczą grupy osób z przeprowadzoną jednorazową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończy dolnej z uciskiem mankietu sfigmomanometru na poziomie 220 mmHg (RIPC_{1x})

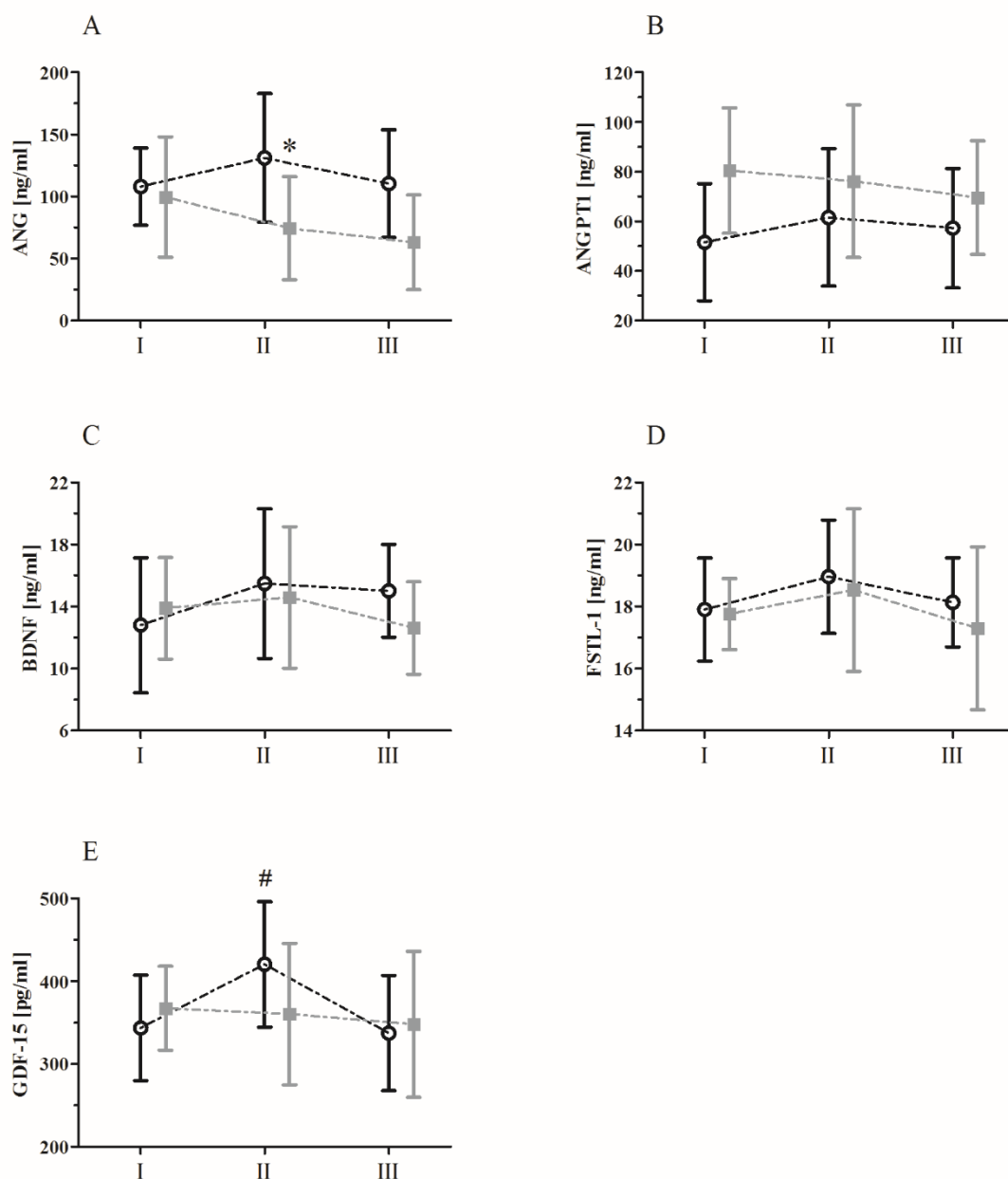
3.4.2. Wpływ jednorazowej procedury zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej na zmiany stężenia markerów stanu zapalnego we krwi indukowanych maksymalnym wysiłkiem anaerobowym

Analiza wariancji stężenia markerów stanu zapalnego we krwi indukowanego maksymalnym wysiłkiem anaerobowym po jednorazowej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej, podobnie jak przed eksperymentem, wykazała istotny efekt czynnika stanowiącego 30s Wingate test w FSTL-1, GDF-15 i TIMP-1 (Tabela 9). Podczas gdy zaobserwowano 5,32% wzrostu stężenia w surowicy FSTL-1 ($p<0,05$) i 10,14% GDF-15 ($p<0,05$) 60min po wysiłku (Rycina 10a), TIMP-1 istotnie zmalało o 14,91% ($p<0,05$; Rycina 12). Ponadto analizy wariancji stężenia markerów GDF-15 oraz TIMP-1 w surowicy po jednorazowej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie indukowanej maksymalnym wysiłkiem anaerobowym wykazały istotną interakcję czynnika grupowego i 30s Wingate test. Wyniki testu post hoc w przypadku GDF-15 pozwoliły zaobserwować z jednej strony istotny wzrost stężenia o 22,44% ($p<0,05$) 60min po wysiłku w grupie SHAM_{1x}, natomiast z drugiej strony wartości stężenia GDF-15 w grupie RIPC_{1x} nie zanotowały widocznych zmian. Analogicznie do GDF-15 wyniki testu post hoc dla stężenia TIMP-1 również nie wykazały istotnych zmian w grupie RIPC_{1x}. Jednakże w grupie SHAM_{1x} zaobserwowane zmiany stężenia TIMP-1 60min po wysiłku zanotowały spadek o 29,20% ($p<0,05$) względem wartości wyjściowych, co wpłynęło również na uzyskanie istotnie niższej wartości w porównaniu do RIPC_{1x} (Rycina 10b). Wyniki stężenia GDF-15 i TIMP-1 120min po wysiłku powróciły do poziomu zbliżonego wartościom wyjściowym. Po jednorazowej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie zauważono także istotny efekt czynnika grupowego wobec zmiany stężenia ANG oraz ANGTP1 we krwi indukowanego 30s testem Wingate. Różnica międzygrupowa dla ANG wyniosła 31,89% ($p<0,05$) a dla ANGTP1 25,33% ($p<0,05$). Ponadto analiza wariancji wyników stężenia ANG wykazała istotną interakcję czynnika grupowego i 30s Wingate test, wskazując na istotną różnicę pomiędzy grupami 60min po wysiłku (43,51%). Wśród pozostałych badanych markerów stanu zapalnego nie zanotowano istotnych efektów po jednorazowej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej.

Tabela 9. Dwuczynnikowa analiza wariancji z powtarzanym pomiarem (2 grupy x 3 punkty czasowe) stężenia markerów stanu zapalnego we krwi po jednorazowej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej indukowanej 30s Wingate testem

Zmienna	Efekt	F (stopnie swobody)	P	Wielkość efektu (η^2)	Post-hoc
ANG	Grupa	8,12 (1, 35)	< 0,01	0,27	SHAM ^{1x} > RIPC ^{1x}
	WAnT	1,81 (1, 35)	0,17	0,07	
	Grupa x WAnT	3,25 (2, 70)	0,04	0,13	II-SHAM ^{1x} > II-RIPC ^{1x}
ANGTP1	Grupa	4,13 (1, 35)	0,05	0,17	SHAM ^{1x} < RIPC ^{1x}
	WAnT	0,41 (1, 35)	0,66	0,02	
	Grupa x WAnT	1,13 (2, 70)	0,33	0,05	
BDNF	Grupa	0,27 (1, 35)	0,60	0,01	
	WAnT	2,31 (1, 35)	0,11	0,10	
	Grupa x WAnT	2,31 (2, 70)	0,11	0,10	
FSTL-1	Grupa	0,48 (1, 35)	0,49	0,02	II > I, III
	WAnT	3,68 (1, 35)	0,03	0,15	
	Grupa x WAnT	0,35 (2, 70)	0,70	0,01	
GDF-15	Grupa	0,10 (1, 35)	0,74	0,01	II > I, III II-SHAM ^{1x} > I, III-SHAM ^{1x}
	WAnT	5,99 (1, 35)	< 0,01	0,22	
	Grupa x WAnT	5,01 (2, 70)	0,01	0,19	
IL-6	Grupa	1,60 (1, 35)	0,22	0,07	
	WAnT	0,49 (1, 35)	0,61	0,02	
	Grupa x WAnT	1,41 (2, 70)	0,25	0,06	
IL-10	Grupa	0,13 (1, 35)	0,71	< 0,01	
	WAnT	0,16 (1, 35)	0,85	< 0,01	
	Grupa x WAnT	0,87 (2, 70)	0,42	0,04	
IL-15	Grupa	0,49 (1, 35)	0,49	0,02	
	WAnT	1,75 (1, 35)	0,18	0,08	
	Grupa x WAnT	1,48 (2, 70)	0,23	0,07	
LIF	Grupa	3,00 (1, 35)	0,09	0,13	
	WAnT	0,08 (1, 35)	0,91	< 0,01	
	Grupa x WAnT	0,21 (2, 70)	0,80	0,01	
OSM	Grupa	2,37 (1, 35)	0,14	0,10	
	WAnT	0,36 (1, 35)	0,69	0,01	
	Grupa x WAnT	0,72 (2, 70)	0,48	0,03	

Skróty: WAnT- Wingate Anaerobic Test; ANG – angiogenia; ANGTP1- angiopoetyna; BDNF -neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego; FSTL-1 – folistatyna; GDF-15 – różnicujący czynnik wzrostu; IL-6 – interleukina 6; IL-10 – interleukina 10, IL-15 – interleukina 15; LIF – czynnik hamujący białaczkę; OSM – onkostatyna m; TIMP-1 inhibitor metaloproteinaz 1; I – pobór krwi w stanie spoczynkowym; II – pobór krwi 60 min po wysiłku; III – pobór krwi 120 min po wysiłku; SHAM^{1x} – grupa osób z przeprowadzoną jednorazową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej z uciskiem mankietu sfigmomanometru na poziomie 20 mmHg; RIPC^{1x} – grupa osób z przeprowadzoną jednorazową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończy dolnej z uciskiem mankietu sfigmomanometru na poziomie 220 mmHg (RIPC^{1x}).

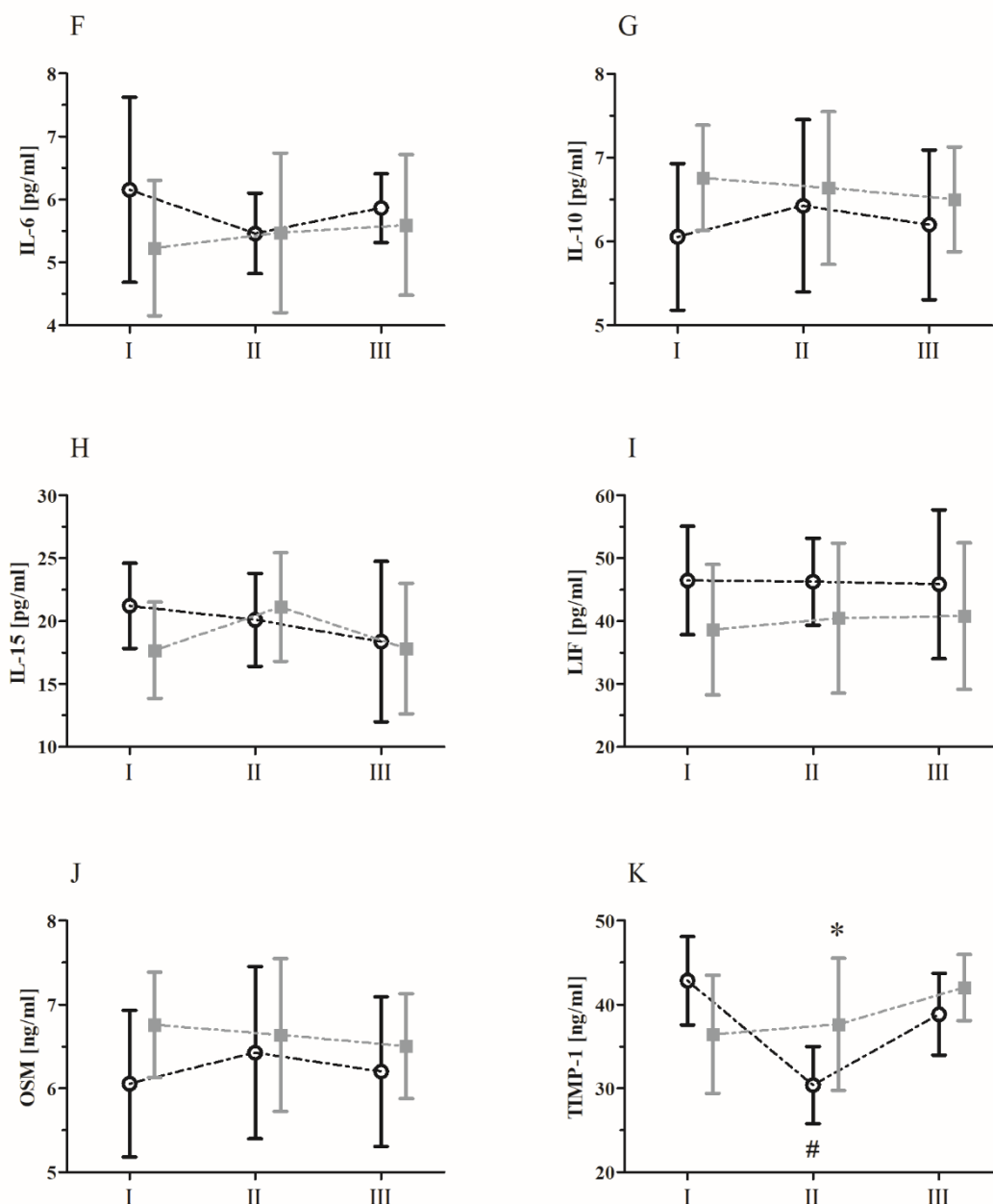


Rycina 10a. Stężenie markerów stanu zapalnego we krwi po jednorazowej procedurze zdalnego hartownia przez niedokrwienie kończyny dolnej indukowanej 30s testem Wingate (wartości średnie i odchylenie standardowe)

Skróty: ANG – angiogenina (A); ANGPT1- angiopoetyna (B); BDNF -neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego (C); FSTL-1 – folistatyna (D); GDF-15 – różnicujący czynnik wzrostu (E), I –pobór krwi w stanie spoczynkowym; II – pobór krwi 60 min po wysiłku; III – pobór krwi 120 min po wysiłku.

Znaczniki: Białe kółka połączone przerywaną linią dotyczą grupy osób z przeprowadzoną jednorazową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej z uciskiem mankietu sfigmomanometru na poziomie 20 mmHg (SHAM_{1x}). Szare kwadraty połączone przerywaną linią dotyczą grupy osób z przeprowadzoną jednorazową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej z uciskiem mankietu sfigmomanometru na poziomie 220 mmHg (RIPC_{1x}).

*istotna różnica pomiędzy grupami na poziomie $p < 0.01$; #istotna różnica pomiędzy poborem krwi w spoczynku na poziomie $p < 0.01$



Rycina 10b. Stężenie markerów stanu zapalnego we krwi po jednorazowej procedurze zdalnego hartownia przez niedokrwienie kończyny dolnej indukowanej 30s Wingate testem (wartości średnie i odchylenie standardowe)

Skróty: IL-6 – interleukina 6 (F); IL-10 – interleukina 10 (G); IL-15 – interleukina 15 (H); LIF – czynnik hamujący białaczkę (I); OSM – onkostatyna m (J); TIMP-1 inhibitor metaloproteinaz 1 (K), I –pobór krwi w stanie spoczynkowym; II – pobór krwi 60 min po wysiłku; III – pobór krwi 120 min po wysiłku.

Znaczniki: Białe kółka połączone przerywaną linią dotyczą grupy osób z przeprowadzoną jednorazową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej z uciskiem mankietu sfigmomanometru na poziomie 20 mmHg (SHAM_{1x}). Szare kwadraty połączone przerywaną linią dotyczą grupy osób z przeprowadzoną jednorazową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej z uciskiem mankietu sfigmomanometru na poziomie 220 mmHg (RIPC_{1x}).

*istotna różnica pomiędzy grupami na poziomie $p < 0.01$; #istotna różnica pomiędzy poborem krwi w spoczynku na poziomie $p < 0.01$

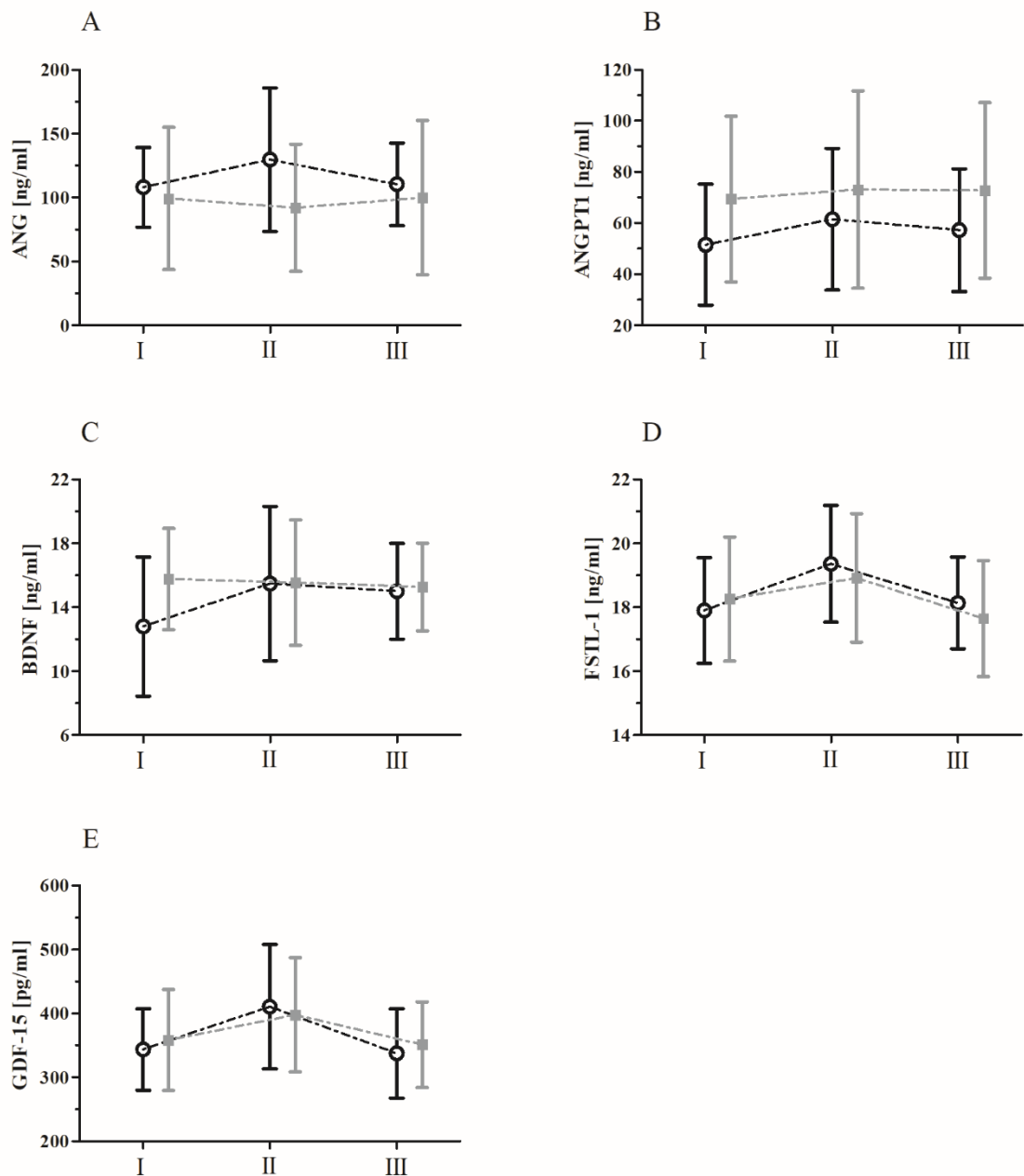
3.4.3. Wpływ maksymalnego wysiłku anaerobowego na zmiany stężenia markerów stanu zapalnego we krwi przed 10 dniową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej

Przeprowadzona analiza wariancji stężenia markerów stanu zapalnego we krwi indukowanego 30s testem Wingate przed 10 dniową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej wykazała istotny efekt czynnika stanowiącego 30s Wingate test jedynie dla FSTL-1, GDF-15 i TIMP-1 (Tabela 10). Niezależnie od podziału grupowego, podczas gdy zanotowano 5,82% wzrostu stężenia FSTL-1 ($p<0,05$) i 15,09% GDF-15 ($p<0,05$) 60min po maksymalnym wysiłku anaerobowym (Rycina 11a), stężenie TIMP-1 zmalało o 16,01% ($p<0,05$; Rycina 11b). Należy również nadmienić, iż 120min po wysiłku stężenia FSTL-1, GDF-15 i TIMP-1 powróciły do wartości zbliżonych poziomowi wyjściowemu, wskazując dodatkowo istotne różnice względem poboru krwi 60min po 30s Wingate test. Wśród pozostałych badanych markerów stanu zapalnego nie zanotowano istotnych efektów przed 10 dniową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie.

Tabela 10. Dwuczynnikowa analiza wariancji z powtarzanym pomiarem (2 grupy x 3 punkty czasowe) stężenia markerów stanu zapalnego we krwi indukowanych 30s Wingate testem przed 10 dniową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej

Zmienna	Efekt	F (stopnie swobody)	P	Wielkość efektu (η^2)	Post-hoc
ANG	Grupa	1,40 (1, 35)	0,24	0,06	
	WAnT	0,26 (1, 35)	0,77	0,01	
	Grupa x WAnT	1,21 (1, 35)	0,30	0,05	
ANGTP1	Grupa	1,55 (1, 35)	0,22	0,06	
	WAnT	1,35 (1, 35)	0,26	0,05	
	Grupa x WAnT	0,28 (1, 35)	0,75	0,01	
BDNF	Grupa	0,82 (1, 35)	0,37	0,03	
	WAnT	1,19 (1, 35)	0,31	0,05	
	Grupa x WAnT	1,96 (1, 35)	0,15	0,05	
FSTL-1	Grupa	7,01 (1, 35)	0,95	< 0,01	II > I, III
	WAnT	5,03 (1, 35)	< 0,01	0,24	
	Grupa x WAnT	1,55 (1, 35)	0,22	0,06	
GDF-15	Grupa	0,03 (1, 35)	0,84	< 0,01	II > I, III
	WAnT	9,22 (1, 35)	< 0,01	0,29	
	Grupa x WAnT	0,51 (1, 35)	0,60	0,02	
IL-6	Grupa	1,19 (1, 35)	0,28	0,05	
	WAnT	3,31 (1, 35)	0,07	0,12	
	Grupa x WAnT	0,10 (1, 35)	0,90	< 0,01	
IL-10	Grupa	0,01 (1, 35)	0,95	< 0,01	
	WAnT	0,64 (1, 35)	0,52	0,02	
	Grupa x WAnT	0,04 (1, 35)	0,96	< 0,01	
IL-15	Grupa	0,65 (1, 35)	0,42	0,02	
	WAnT	0,76 (1, 35)	0,47	0,03	
	Grupa x WAnT	0,40 (1, 35)	0,66	0,01	
LIF	Grupa	0,01 (1, 35)	0,93	< 0,01	
	WAnT	1,17 (1, 35)	0,31	0,05	
	Grupa x WAnT	0,88 (1, 35)	0,42	0,03	
OSM	Grupa	0,31 (1, 35)	0,58	0,01	
	WAnT	0,16 (1, 35)	0,84	< 0,01	
	Grupa x WAnT	0,85 (1, 35)	0,43	0,03	
TIMP-1	Grupa	8,57 (1, 35)	< 0,01	0,28	II > I, III
	WAnT	2,99 (1, 35)	< 0,01	0,49	
	Grupa x WAnT	0,62 (1, 35)	0,53	0,02	

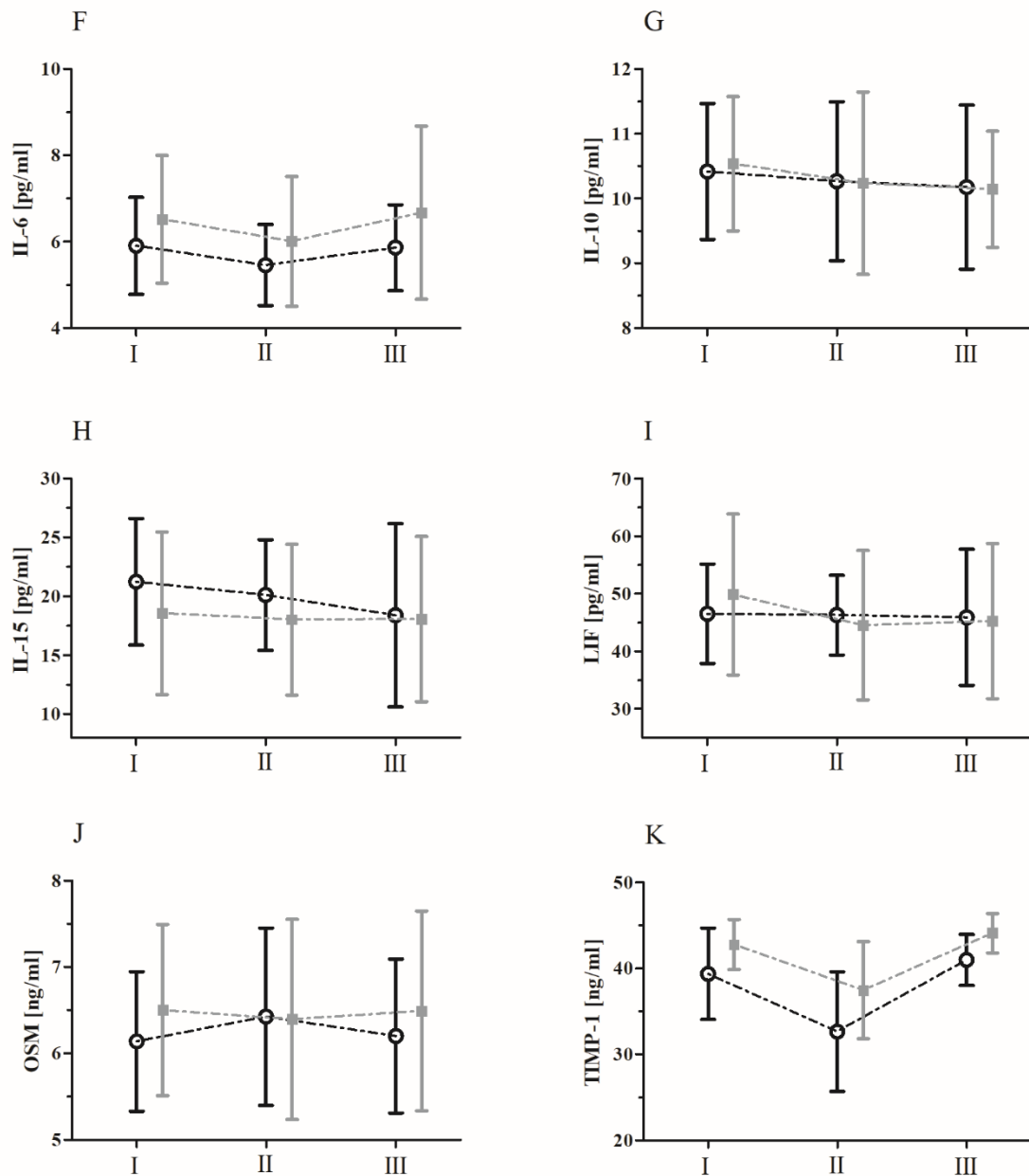
Skróty; ANG – angiogenia; ANG1- angiopoetyna; BDNF -neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego; FSTL-1 – folistatyna; GDF-15 – różnicujący czynnik wzrostu; IL-6 – interleukina 6; IL-10 – interleukina 10, IL-15 – interleukina 15; LIF – czynnik hamujący białaczkę; OSM – onkostatyna m; TIMP-1 inhibitor metaloproteinaz 1; WAnT –Wingate Anaerobic Test; I –pobór krwi w stanie spoczynkowym; II – pobór krwi 60 min po wysiłku; III – pobór krwi 120 min po wysiłku



Rycina 11a. Stężenie markerów stanu zapalnego we krwi indukowanych 30s Wingate testem przed 10 dniową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej (wartości średnie i odchylenie standardowe).

Skróty: ANG – angiogenina (A); ANGPT1- angiopoetyna (B); BDNF -neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego (C); FSTL-1 – folistatyna (D); GDF-15 – różnicujący czynnik wzrostu (E), I –pobór krwi w stanie spoczynkowym; II – pobór krwi 60 min po wysiłku; III – pobór krwi 120 min po wysiłku.

Znaczniki: Białe kółka połączone przerywaną linią dotyczą grupy osób z przeprowadzoną 10 dniową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej z uciskiem mankietu sfigmomanometru na poziomie 20 mmHg (SHAM_{10x}). Szare kwadraty połączone przerywaną linią dotyczą grupy osób z przeprowadzoną 10 dniową procedura zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończy dolnej z uciskiem mankietu sfigmomanometru na poziomie 220 mmHg (RIPC_{10x}).



Rycina 11b. Stężenie markerów stanu zapalnego we krwi indukowanych 30s Wingate testem przed 10 dniową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej (wartości średnie i odchylenie standardowe).

Skróty: IL-6 – interleukina 6 (F); IL-10 – interleukina 10 (G); IL-15 – interleukina 15 (H); LIF – czynnik hamujący białaczkę (I); OSM – onkostatyna m (J); TIMP-1 inhibitor metaloproteinaz 1 (K); I – pobór krwi w stanie spoczynkowym; II – pobór krwi 60 min po wysiłku; III – pobór krwi 120 min po wysiłku.

Znaczniki: Białe kółka połączone przerywaną linią dotyczą grupy osób z przeprowadzoną 10 dniową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej z uciskiem mankietu sfigmomanometru na poziomie 20 mmHg (SHAM). Szare kwadraty połączone przerywaną linią dotyczą grupy osób z przeprowadzoną 10 dniową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej z uciskiem mankietu sfigmomanometru na poziomie 220 mmHg (RIPC).

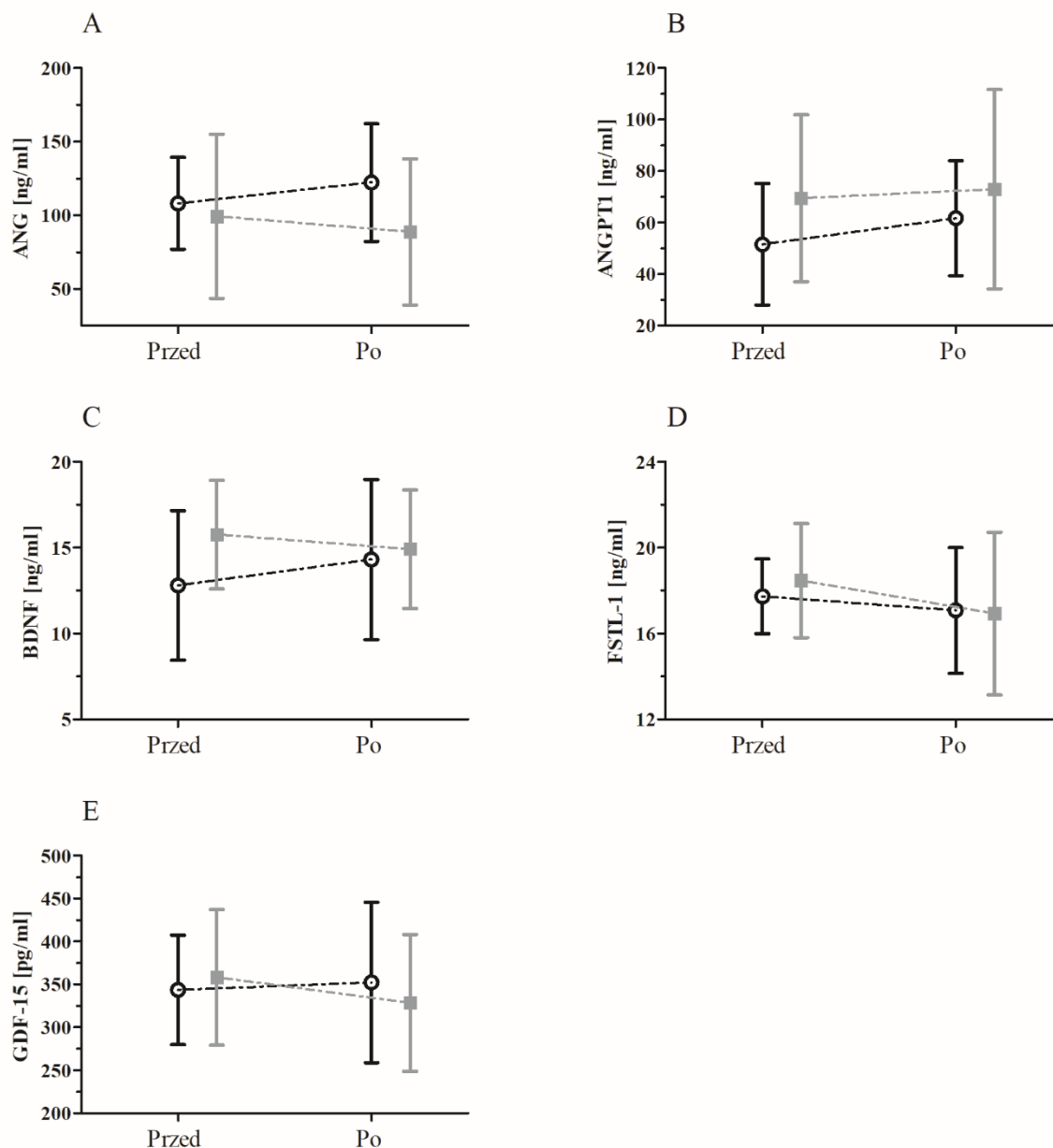
3.4.4. Wpływ 10 dniowej procedury zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej na zmiany stężenia wyjściowego markerów stanu zapalnego we krwi

Analizę wariancji badanych markerów stanu zapalnego indukowanych 10 dniową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie zaprezentowano w Tabeli 11.

Tabela 11. Dwuczynnikowa analiza wariancji z powtarzanym pomiarem (2 grupy x 2 punkty czasowe) stężenia wyjściowego markerów stanu zapalnego we krwi indukowanych 10 dniową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej

Zmienna	Efekt	F (stopnie swobody)	P	Wielkość efektu (η^2)
ANG	Grupa	1,63 (1, 35)	0,21	0,06
	P-RIPC _{10x}	0,05 (1, 35)	0,82	0,01
	Grupa x P-RIPC _{10x}	2,32 (2, 70)	0,14	0,09
ANGTP1	Grupa	1,86 (1, 35)	0,18	0,07
	P-RIPC _{10x}	1,29 (1, 35)	0,26	0,05
	Grupa x P-RIPC _{10x}	0,30 (2, 70)	0,58	0,01
BDNF	Grupa	1,87 (1, 35)	0,18	0,07
	P-RIPC _{10x}	0,11 (1, 35)	0,73	0,01
	Grupa x P-RIPC _{10x}	1,51 (2, 70)	0,23	0,06
FSTL-1	Grupa	0,08 (1, 35)	0,76	< 0,01
	P-RIPC _{10x}	3,15 (1, 35)	0,08	0,12
	Grupa x P-RIPC _{10x}	0,51 (2, 70)	0,47	0,02
GDF-15	Grupa	0,02 (1, 35)	0,87	< 0,01
	P-RIPC _{10x}	0,44 (1, 35)	0,51	0,02
	Grupa x P-RIPC _{10x}	1,45 (2, 70)	0,24	0,06
IL-6	Grupa	3,17 (1, 35)	0,08	0,12
	P-RIPC _{10x}	2,96 (1, 35)	0,09	0,11
	Grupa x P-RIPC _{10x}	0,11 (2, 70)	0,73	< 0,01
IL-10	Grupa	0,94 (1, 35)	0,34	0,04
	P-RIPC _{10x}	2,07 (1, 35)	0,16	0,08
	Grupa x P-RIPC _{10x}	0,34 (2, 70)	0,34	0,04
IL-15	Grupa	0,13 (1, 35)	0,71	< 0,01
	P-RIPC _{10x}	0,66 (1, 35)	0,42	0,02
	Grupa x P-RIPC _{10x}	1,80 (2, 70)	0,19	0,07
LIF	Grupa	0,13 (1, 35)	0,71	< 0,01
	P-RIPC _{10x}	2,61 (1, 35)	0,11	0,10
	Grupa x P-RIPC _{10x}	0,16 (2, 70)	0,68	< 0,01
OSM	Grupa	0,50 (1, 35)	0,48	0,02
	P-RIPC _{10x}	0,61 (1, 35)	0,44	0,02
	Grupa x P-RIPC _{10x}	0,61 (2, 70)	0,43	0,02
TIMP-1	Grupa	0,98 (1, 35)	0,75	< 0,01
	P-RIPC _{10x}	0,14 (1, 35)	0,70	< 0,01
	Grupa x P-RIPC _{10x}	3,72 (2, 70)	0,07	0,13

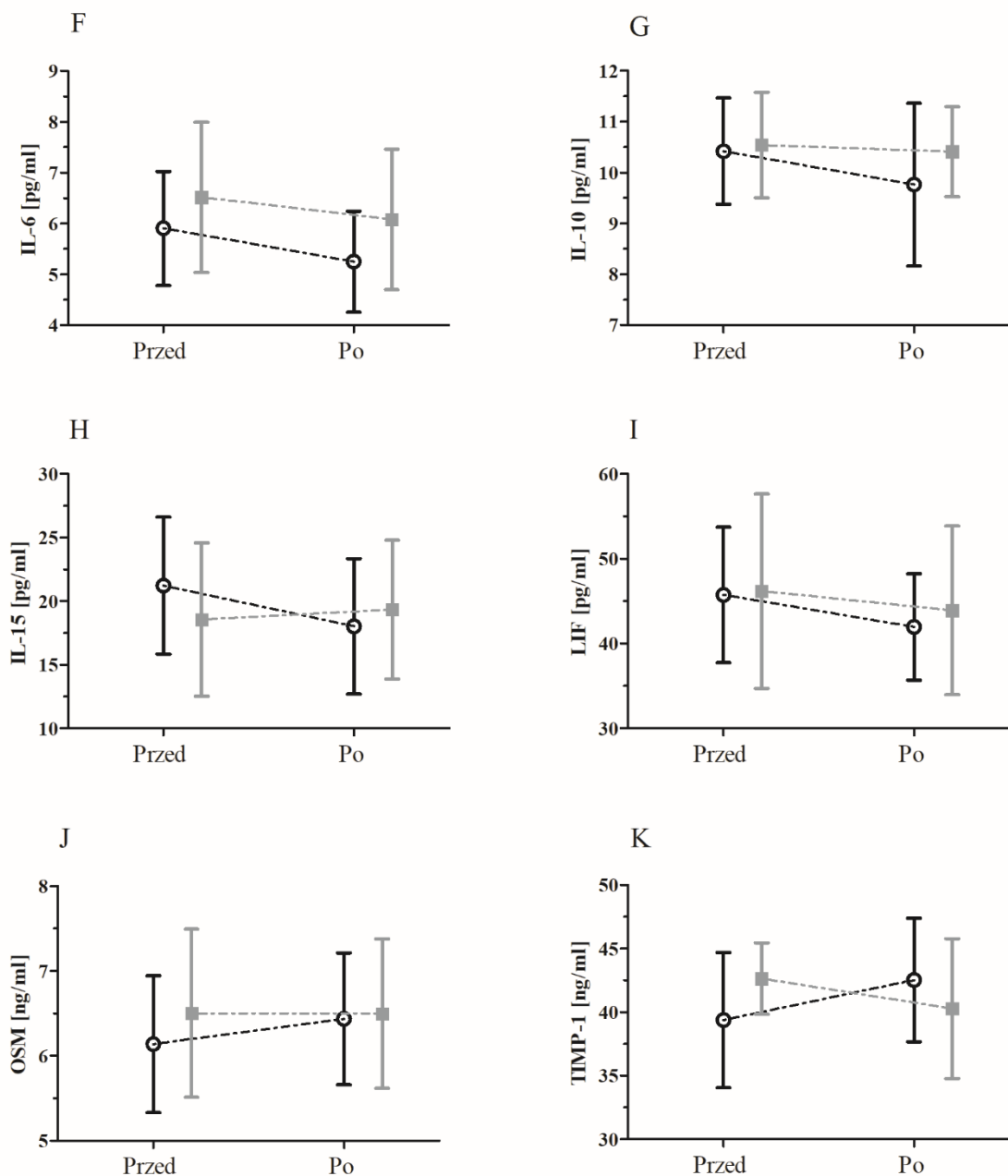
Skróty; ANG – angiogenia; ANG1- angiopoetyna; BDNF -neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego; FSTL-1 – folistatyna; GDF-15 – różnicujący czynnik wzrostu; IL-6 – interleukina 6; IL-10 – interleukina 10, IL-15 – interleukina 15; LIF – czynnik hamujący białaczkę; OSM – onkostatyna m; TIMP-1 inhibitor metaloproteinaz1; P-RIPC_{10x} – 10 dniowa procedura zdalnego hartowania przez niedokrwienie;



Rycina 12a. Wyjściowe stężenie markerów stanu zapalnego we krwi przed i po 10 dniowej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej (wartości średnie ± odchylenie standardowe)

Skróty: ANG – angiogenina (A); ANGPT1- angiopoetyna (B); BDNF -neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego (C); FSTL-1 – folistatyna (D); GDF-15 – różnicujący czynnik wzrostu (E).

Znaczniki: Białe kółka połączone przerywaną linią dotyczą grupy osób z przeprowadzoną 10 dniową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej z uciskiem mankietu sfigmomanometru na poziomie 20 mmHg (SHAM_{10x}). Szare kwadraty połączone przerywaną linią dotyczą grupy osób z przeprowadzoną 10 dniową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej z uciskiem mankietu sfigmomanometru na poziomie 220 mmHg (RIPC_{10x})



Rycina 12b. Stężenie markerów stanu zapalnego we krwi przed i po 10 dniowej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej (wartości średnie i odchylenie standardowe)

Skróty: IL-6 – interleukina 6 (F); IL-10 – interleukina 10 (G); IL-15 – interleukina 15 (H); LIF – czynnik hamujący białaczkę (I); OSM – onkostatyna m (J); TIMP-1 inhibitor metaloproteinaz 1 (K).

Znaczniki: Białe kółka połączone przerywaną linią dotyczą grupy osób z przeprowadzoną 10 dniową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej z uciskiem mankietu sfigmomanometru na poziomie 20 mmHg (SHAM_{10x}). Szare kwadraty połączone przerywaną linią dotyczą grupy osób z przeprowadzoną 10 dniową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej z uciskiem mankietu sfigmomanometru na poziomie 220 mmHg (RIPC_{10x})

Na podstawie przeprowadzonej analizy, zarówno przed jak i po eksperymencie, nie zanotowano różnic pomiędzy grupami. Zaobserwowane w grupie $RIPC_{10x}$ i $SHAM_{10x}$ kierunki niewielkich zmian w stężeniach badanych markerów stanu zapalnego nie pozwalają stwierdzić istotnego wpływu samej 10 dniowej procedury zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej (Rycina 12a i 12b).

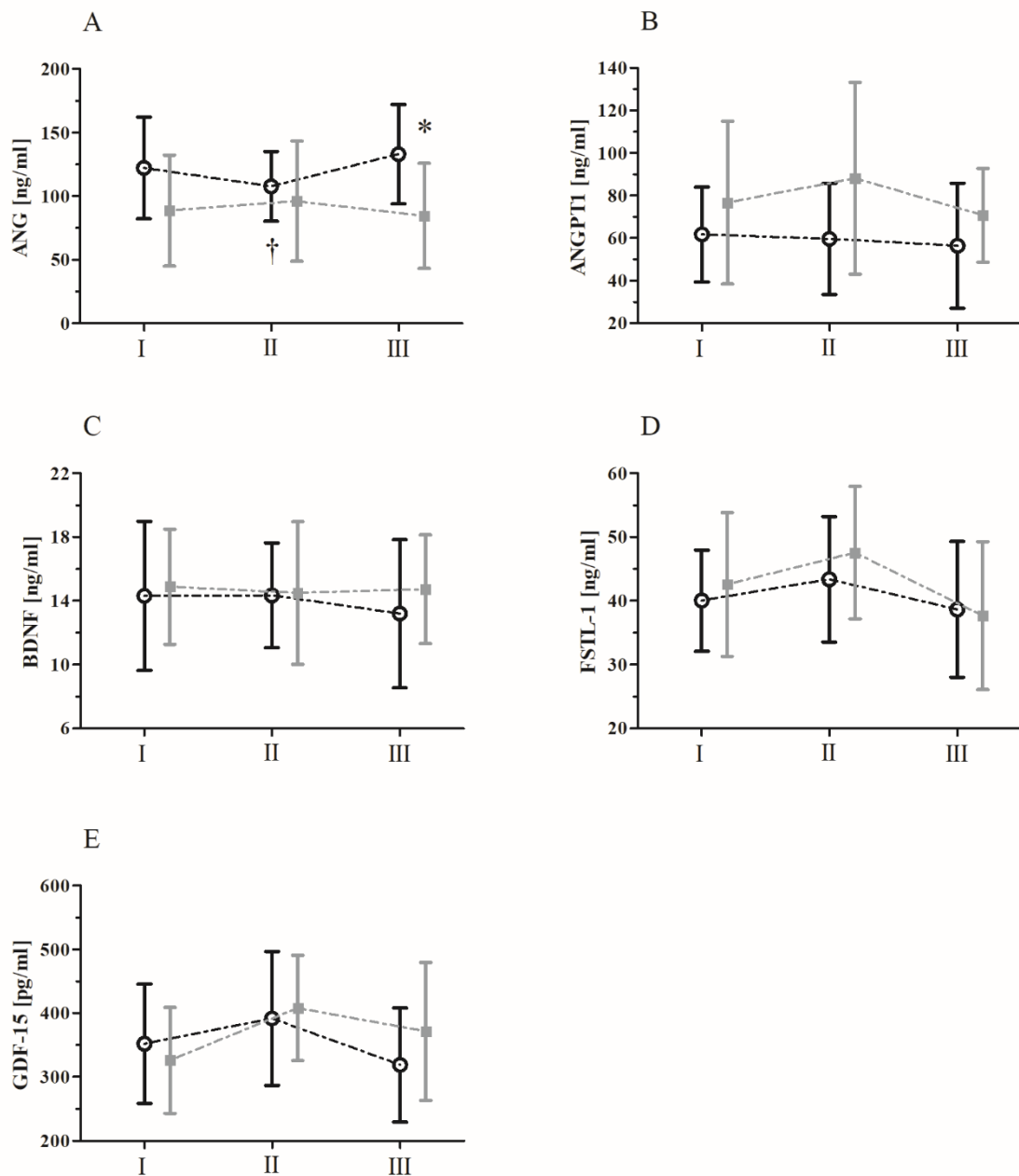
3.4.5. Wpływ 10 dniowej procedury zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej na zmiany stężenia markerów stanu zapalnego we krwi indukowanych maksymalnym wysiłkiem anaerobowym

Analiza wariancji stężenia markerów stanu zapalnego we krwi indukowanych maksymalnym wysiłkiem anaerobowym po 10 dniowym eksperymencie zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej ponownie wykazała istotny efekt czynnika stanowiącego 30s Wingate test dla FSTL-1, GDF-15 i TIMP-1 (Tabela 11). Podczas gdy zaobserwowano wzrost stężenia FSTL-1 o 10,71% ($p<0,05$) i 17,69% GDF-15 ($p<0,05$) 60min po wysiłku, w tym czasie TIMP-1 zanotowało spadek o 19,37% ($p<0,05$). Istotny efekt czynnika 30s Wingate test zanotowano również dla stężenia LIF. Niezależnie od podziału grupowego najwyższe poziomy LIF zanotowano 60min po wysiłku, jednakże istotne różnice widoczne były jedynie pomiędzy drugim (60min) a trzecim poborem krwi (120min). Analiza wariancji po 10 dniowej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie także wykazała istotne interakcje czynnika grupowego i maksymalnego wysiłku anaerobowego dla ANG, IL-6 oraz TIMP-1 (Rycina 13a i 13b). W przypadku ANG, wyniki testu post hoc wykazały, że podczas gdy w grupie $SHAM_{10x}$ zanotowano 24,29% ($p<0,05$) wzrostu stężenia w surowicy pomiędzy drugim (60min) i trzecim (120min) poborem krwi po WAnT, to w grupie $RIPC_{10x}$ zaobserwowano nieznaczny spadek. W wyniku powyższych zmian zanotowano również istotną różnicę pomiędzy grupami 120min po wysiłku. Podobne zamiany na skutek maksymalnego wysiłku anaerobowego zauważono w stężeniu IL-6. Podczas gdy w grupie $RIPC_{10x}$ zaobserwowano niewielki spadek stężenia pomiędzy drugim (60min) a trzecim poborem krwi (120min) 30s Wingate test, w grupie $SHAM_{10x}$ zanotowano wzrost o 19,01% ($p<0,05$), co miało związek z istotną różnicą pomiędzy grupami 120min WAnT. Odwrotną zależność można było zaobserwować wobec zmian stężenia TIMP-1.

Tabela 12. Dwuczynnikowa analiza wariancji z powtarzanym pomiarem (2 grupy x 3 punkty czasowe) markerów stanu zapalnego we krwi po 10 dniowej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej indukowanej 30s Wingate testem

Zmienna	Efekt	F (stopnie swobody)	P	Wielkość efektu (η^2)	Post-hoc
ANG	Grupa	3,64 (1, 35)	0,07	0,14	II-SHAM _{10x} < III-SHAM _{10x} III-SHAM _{10x} > III-RIPC _{10x}
	WAnT	0,57 (1, 35)	0,56	0,02	
	Grupa x WAnT	4,13 (2, 70)	0,02	0,16	
ANGTP1	Grupa	2,95 (1, 35)	0,10	0,12	
	WAnT	1,50 (1, 35)	0,23	0,06	
	Grupa x WAnT	0,90 (2, 70)	0,41	0,04	
BDNF	Grupa	0,33 (1, 35)	0,56	0,01	
	WAnT	0,23 (1, 35)	0,79	0,01	
	Grupa x WAnT	0,27 (2, 70)	0,76	0,01	
FSTL-1	Grupa	0,07 (1, 35)	0,78	< 0,01	II > I, III
	WAnT	3,22 (1, 35)	0,04	0,13	
	Grupa x WAnT	0,32 (2, 70)	0,72	0,01	
GDF-15	Grupa	0,21 (1, 35)	0,64	0,01	II > I, III
	WAnT	5,00 (1, 35)	0,01	0,19	
	Grupa x WAnT	1,72 (2, 70)	0,19	0,07	
IL-6	Grupa	0,82 (1, 35)	0,37	0,03	III-SHAM _{10x} > I, II-SHAM _{10x} III-RIPC _{10x} < I-RIPC _{10x} III-SHAM _{10x} > III-RIPC _{10x}
	WAnT	0,05 (1, 35)	0,95	< 0,01	
	Grupa x WAnT	6,70 (2, 70)	< 0,01	0,24	
IL-10	Grupa	3,16 (1, 35)	0,09	0,13	
	WAnT	0,59 (1, 35)	0,55	0,02	
	Grupa x WAnT	0,50 (2, 70)	0,60	0,02	
IL-15	Grupa	0,11 (1, 35)	0,73	< 0,01	
	WAnT	0,27 (1, 35)	0,76	0,01	
	Grupa x WAnT	1,54 (2, 70)	0,22	0,06	
LIF	Grupa	0,31 (1, 35)	0,57	0,01	II > III
	WAnT	3,63 (1, 35)	0,03	0,14	
	Grupa x WAnT	0,46 (2, 70)	0,62	0,02	
OSM	Grupa	1,97 (1, 35)	0,17	0,08	
	WAnT	0,85 (1, 35)	0,43	0,04	
	Grupa x WAnT	1,21 (2, 70)	0,30	0,05	
TIMP-1	Grupa	0,79 (1, 35)	0,38	0,03	II < I, III II-SHAM _{10x} < I, III-SHAM _{10x} II-SHAM _{10x} < II-RIPC _{10x}
	WAnT	17,85 (1, 35)	< 0,01	0,44	
	Grupa x WAnT	5,36 (2, 70)	< 0,01	0,19	

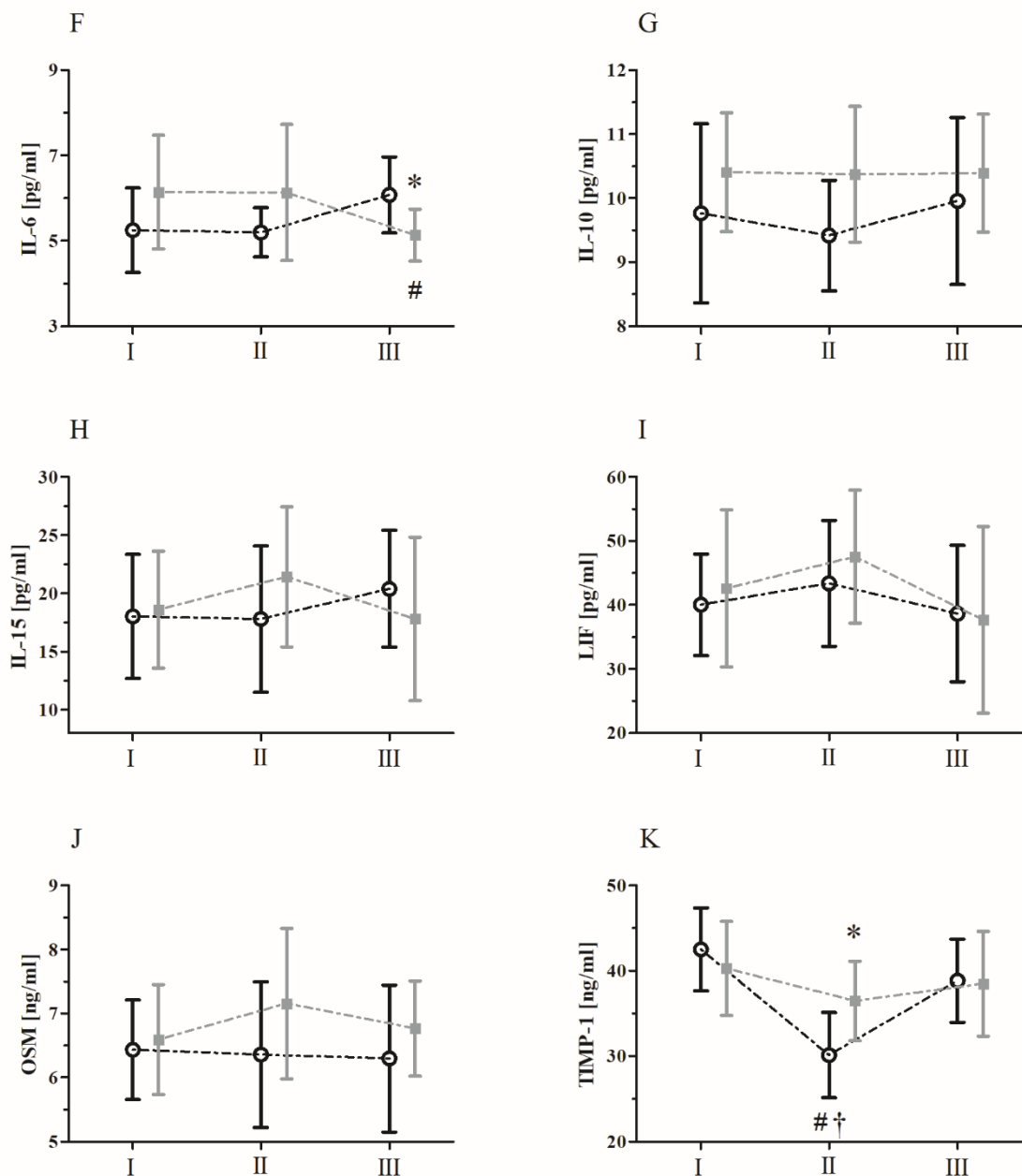
Skróty; ANG – angiogenia; ANGPT1- angiopoetyna; BDNF -neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego; FSTL-1 – folistatyna; GDF-15 – różnicujący czynnik wzrostu; IL-6 – interleukina 6; IL-10 – interleukina 10, IL-15 – interleukina 15; LIF – czynnik hamujący białaczkę; OSM – onkostatyna m; TIMP-1 inhibitor metaloproteinaz 1. WAnT- Wingate Anaerobic Test; I –pobór krwi w stanie spoczynkowym; II – pobór krwi 60 min po wysiłku; III – pobór krwi 120 min po wysiłku; SHAM_{10x} – grupa osób z przeprowadzoną 10 dniową procedurą hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej z uciskiem mankieta sfingonanometrycznego na poziomie 20 mmHg; RIPC_{10x} - grupa osób z przeprowadzoną 10 dniową procedurą hartowania przez niedokrwienie kończy dolnej z uciskiem mankieta sfingonanometrycznego na poziomie 220mmHg.



Rycina 13a. Stężenie markerów stanu zapalnego we krwi po 10 dniowej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej indukowanej 30s Wingate testem (wartości średnie i odchylenie standardowe).

Skróty: ANG – angiogenina (A); ANGPT1- angiopoetyna (B); BDNF -neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego (C); FSTL-1 – folistatyna (D); GDF-15 – różnicujący czynnik wzrostu (E); I –pobór krwi w stanie spoczynkowym; II – pobór krwi 60 min po wysiłku; III – pobór krwi 120 min po wysiłku.

Znaczniki: Białe kółka połączone przerywaną linią dotyczą grupy osób z przeprowadzoną jednorazową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej z uciskiem mankietu sfigmomanometru na poziomie 20 mmHg (SHAM_{10x}). Szare kwadraty połączone przerywaną linią dotyczą grupy osób z przeprowadzoną jednorazową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej z uciskiem mankietu sfigmomanometru na poziomie 220 mmHg (RIPC_{10x}); *istotna różnica pomiędzy grupami na poziomie $p < 0.01$; † istotna różnica pomiędzy III poborem krwi



Rycina 13b. Stężenie markerów stanu zapalnego we krwi po 10 dniowej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej indukowanej 30s Wingate testem (wartości średnie i odchylenie standardowe).

Skróty: IL-6 – interleukina 6 (F); IL-10 – interleukina 10 (G); IL-15 – interleukina 15 (H); LIF – czynnik hamujący białaczkę (I); OSM – onkostatyna m (J); TIMP-1 inhibitor metaloproteinaz 1 (K); I – pobór krwi w stanie spoczynkowym; II – pobór krwi 60 min po wysiłku; III – pobór krwi 120 min po wysiłku.

Znaczniki: Białe kółka połączone przerywaną linią dotyczą grupy osób z przeprowadzoną jednorazową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej z uciskiem mankietu sfigmomanometru na poziomie 20 mmHg (SHAM_{10x}). Szare kwadraty połączone przerywaną linią dotyczą grupy osób z przeprowadzoną jednorazową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej z uciskiem mankietu sfigmomanometru na poziomie 220 mmHg (RIPC_{10x}). *istotna różnica pomiędzy grupami na poziomie $p < 0,01$; #istotna różnica pomiędzy poborem krwi w spoczynku na poziomie $p < 0,01$; † istotna różnica pomiędzy poborem krwi 120min po wysiłku na poziomie $p < 0,01$

Wyniki testu post hoc wykazały, że tylko w grupie SHAM_{10x} zanotowano 29,17% ($p<0,05$) spadek stężenia TIMP-1 60min po maksymalnym wysiłku anaerobowym względem wartości wyjściowych. Ponadto w drugim poborze krwi (60min po WAnT) zauważono również o 20,93% ($p<0.05$) niższe wartości stężenia TIMP-1 w grupie SHAM_{10x} w porównaniu do RIPC. Analizy wariancji wśród pozostałych badanych markerów stanu zapalnego nie zanotowały istotnych efektów po 10 dniowej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej.

IV DYSKUSJA

Zważywszy na dotychczasowe osiągnięcia stosowanych metod hartowania przez niedokrwienie oraz ich kierunków oddziaływania, w niniejszej pracy po raz pierwszy podjęto próbę skonfrontowania wpływu zarówno jednorazowej, jak i 10 dniowej procedury zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej na zmiany odpowiedzi zapalnej indukowanej maksymalnym wysiłkiem aerobowym. Szereg dostępnych publikacji opisujących krótkotrwałe epizody przejściowego niedokrwienia podkreślają istotny wpływ IPC na poprawę poziomu możliwości wysiłkowych człowieka (de Groot, Thijssen et al. 2010; Crisafulli, Tangianu et al. 2011; Bailey, Jones et al. 2012; Paradis-Deschenes, Joannis et al. 2018). Jednakże oddziaływanie hartowania przez niedokrwienie na mechanizmy ochronne zabezpieczające tkanki przed nadmiernym uszkodzeniem wskutek wysiłku fizycznego w dalszym ciągu pozostają niewyjaśnione. Badanie złożoności oddziaływania procedury zdalnego hartowania przez niedokrwienie na organizm człowieka i jego wpływu na maksymalne możliwości anaerobowe w świetle przemian biochemicznych może okazać się istotne w zastosowaniu tej metody zarówno w treningu sportowym jak i fizjoterapii.

W związku z powyższym, przeprowadzone badanie miało za zadanie określić wpływ randomizowanego, krzyżowego eksperymentu jednorazowej oraz 10 dniowej procedury zdalnego hartowania przez niedokrwienie jednej kończyny dolnej na zmiany fizjologiczne i biochemiczne indukowane wysiłkiem maksymalnym. Celem głównym pracy było określenie, czy jednorazowa oraz 10 dniowa procedura zdalnego hartowania przez niedokrwienie wykonana na niedominującej kończynie dolnej wpłynie na zmiany poziomu stężeń wybranych markerów biochemicznych indukowanych 30 sekundowym testem Wingate. Celem dodatkowym była ocena, czy samo wykonanie jednorazowej bądź 10 dniowej procedury RIPC wpłynie na zmiany poziomu stężenia wybranych markerów w krwi żyłnej.

W celu uzyskania odpowiedzi na postawione pytania badawcze posłużono się obiektywnymi metodami oceny badanych zmiennych takich jak: analiza składu ciała przy pomocy bioimpedancji elektrycznej, ocena pomiaru maksymalnych możliwości anaerobowych kończyn dolnych na ergometrze rowerowym (30 sekundowy Wingate Test) oraz analiza biochemiczna wybranych markerów świadczących o nasilonej odpowiedzi powysiłkowej w surowicy krwi.

Analiza składu ciała

W niniejszej pracy doktorskiej posłużono się obiektywną oceną składu ciała przy pomocy tetrapolarnego, ośmioelektrodowego, wieloczęstotliwościowego analizatora bioimpedacyjnego InBody 720 Body Composition Analyser. Dobór zastosowanej metody badawczej wynikał z jej rzetelności oraz wysokiej powtarzalności uzyskanych wyników, która została potwierdzona między innymi w pracy McLester, Nickerson et al. (2020). Zastosowanie techniki impedancji bioelektrycznej z wykorzystaniem aparatu InBody 720 w ocenie składu ciała pozwala na segmentarną analizę zawartości tkanek i ich lokalizacji (Gibson, Holmes et al. 2008). Rzetelność tej metody odpowiada uznanym i dużo droższym standardom segmentarnej analizy ciała człowieka jak technika dwuenergetycznej absorpcjometrii rentgenowskiej (DXA), technika rezonansu magnetycznego (MRI) i inne (McLester, Nickerson et al. 2020).

Uzyskane wyniki bezsprzecznie dowodzą o podobieństwie obu populacji, a brak istotnych różnic potwierdza losowy charakter doboru populacji do badania.

Nie wykazano również zamian składu ciała po zakończeniu badań, co wskazuje wykluczenie wpływu procedury zdalnego hartowania przez niedokrwienie na badane cechy somatyczne oraz innych czynników takich jak, zmiana nawyków żywienia, infekcje wirusowe i pozostałych w trakcie badań.

Wpływ zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej na poziom wartości maksymalnych możliwości anaerobowych w 30s teście Wingate

W licznych pracach z zakresu nauk o kulturze fizycznej poziom maksymalnych możliwości anaerobowych przedstawiany jest za pomocą 30 sekundowego anaerobowego testu Wingate. Opracowany został on w latach siedemdziesiątych XX wieku w Zakładzie Badań i Medycyny Sportowej Instytutu Wychowania Fizycznego i Sportu Wingate w Izraelu. Od momentu wprowadzenia prototypu ergometru rowerowego pozwalającego na wykonanie testu w 1974 roku (Ayalon, Inbar et al. 1974), Wingate Anaerobic Test jest stosowany w różnych laboratoriach zarówno jako oceniający wydolność beztlenową, jak również jako zadanie ruchowe, które może pomóc w analizie odpowiedzi organizmu na wysiłek supramaksymalny. Opracowany przez Bar-Or (1987) Wingate Anaerobic Test w wersji 30 sekundowej z pełnym oporem koła zamachowego na ergometrze rowerowym Ergomedic 894E firmy Monark uznany jest przez wielu specjalistów za trafny i rzetelny w ocenie stanu

możliwości anaerobowych. Kryterium tego testu jest umiejętność wykonania wysiłku fizycznego w czasie 30 sekund z maksymalną intensywnością. Możliwe jest to tylko przy zastosowaniu ciągłego dopingowania werbalnego osób realizujących próbę wysiłkową od momentu rozpoczęcia próby aż do jej zakończenia.

W związku powyższym, do analizy wpływu procedury zdalnego hartowania przez niedokrwienie jednej kończyny dolnej na poziom możliwości beztlenowych obu kończyn dolnych wybrano 30s Wingate Anaerobic Test. W wyniku przeprowadzonych badań w grupie RIPC_{10x}, która wykonała 10 dniową procedurę zdalnego hartowania przez niedokrwienie jednej kończyny dolnej zaobserwowano istotny wzrost bezwzględnych wartości mocy średniej oraz mocy maksymalnej w przeciwieństwie do grupy SHAM_{10x}. Podobny efekt uzyskano w pracy Mieszkowski, Kochanowicz et al. (2019) gdzie wykonano również 10 dniową procedurę hartowania przez niedokrwienie obu ramion, która pozwoliła zaobserwować istotną poprawę średniej mocy względnej z $5,29 \pm 0,50$ do $5,79 \pm 0,70$ W/kg, ($p < 0,05$) w ręcznym teście Wingate.

W porównaniu do poprawy wyników wydolności beztlenowej po 10 dniowej procedurze RIPC, efekt pojedynczej procedury zdalnego hartowania przez niedokrwienie okazał się nieistotny. Chociaż warto podkreślić, że uzyskane wartości w grupie RIPC_{1x} wykazały niewielką tendencję wzrostową względnej mocy średniej i szczytowej oraz nieco krótszy czas osiągnięcia mocy maksymalnej po jednorazowym zdalnym hartowaniu przez niedokrwienie. Również brak efektu zdalnego hartowania przez niedokrwienie na maksymalne możliwości anaerobowe w teście Wingate wykazano w badaniu krzyżowym Lalonde and Curnier (2015). Autorzy swoje wyniki zaprezentowali na populacji 17 młodych studentów należących do klubu triathlonowego, których losowo przydzielono do grupy RIPC wykonującej zacisk jednego ramienia na poziomie 50 mmHg oraz do grupy SHAM wykonującej zacisk na poziomie 10 mmHg. Po przeprowadzonej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie, polegającej na czterokrotnej okluzji i reperfuzji trwającej 5 minut wykonano próbę wysiłkową, w której uzyskane wartości mocy szczytowej kończyn dolnych wyniosły 794 w dla grupy RIPC oraz 777 w dla grupy SHAM ($p = 0,208$). Warto zaznaczyć, że zacisk na poziomie 50 mmHg nie spowodował całkowitego zamknięcia naczynia, co mogło wpłynąć na uzyskany rezultat badania. Ponadto autorzy pracy nie podali czasu jaki upłynął pomiędzy zakończeniem procedury RIPC a testem Wingate.

Także w badaniach Mieszkowski, Kochanowicz et al. (2019) pomimo zacisku na poziomie 220 mmHg podczas wykonania jednorazowej procedury hartowania przez niedokrwienie obu ramion, wyniki Mieszkowski, Kochanowicz et al. (2019) testu Wingate nie

przyniosły poprawy maksymalnych możliwości anaerobowych kończyn górnych w zakresie względnej mocy szczytowej oraz względnej mocy średniej.

Z drugiej strony jeszcze bardziej zaskakujące mogą wydawać się wyniki badania Paixao, da Mota et al. (2014), które ujawniły pogorszenie maksymalnych możliwości anaerobowych zarówno w pierwszym, jak i drugim teście Wingate wykonywanym po zastosowaniu jednorazowej procedury IPC. W tym badaniu autorzy wykonali nieco odmienny protokół hartowania przez niedokrwienie, gdzie cztery cykle 5 minutowej okluzji i 5 minutowej reperfuzji wykonane były na każdym udzie o zacisku wyższym niż zazwyczaj (250 mmHg). Należy nadmienić, że osiągnięcie zacisku na poziomie 220 mmHg powoduje całkowite zamknięcie światła tętnicy w poddanej okluzji kończynie. Z punktu widzenia klinicznego wartość ta wydaje się bezpieczniejsza ze względów możliwości oporowych naczyń oraz jego elastyczności (Mieszkowski, Kochanowicz et al. 2019).

Biorąc pod uwagę wyniki powyższych prac badawczych, jednorazowa procedura hartowania przez niedokrwienie może nie być wystarczającym bodźcem przyczyniającym się do wywołania korzystnych zmian możliwości anaerobowych człowieka. Konieczne wydaje się wielokrotne wykonanie procedury hartowania celem aktywowania mechanizmów przystosowawczych pozwalających na zmiany zarówno o podłożu fizjologicznym, jak i biochemicznym. Oczywiście należy jednak pamiętać, że brak zauważalnych zmian parametrów mechanicznych nie jest tożsamy z brakiem odpowiedzi organizmu na poziomie komórkowym oraz tkankowym.

Wpływ zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej na poziom wybranych markerów biochemicznych we krwi indukowanych 30s Wingate Test

Mając na uwadze przeprowadzone analizy wpływu zdalnego hartowania przez niedokrwienie na maksymalne możliwości anaerobowe kończyn dolnych, nasuwa się pytanie, czy i jakie mechanizmy wewnątrztkankowe odpowiadają za zaobserwowane zmiany. Dotychczasowe badania dotyczące skuteczności hartowania przez niedokrwienie w obszarze nauk o kulturze fizycznej opierały się głównie o specyficzne testy sprawności fizycznej. W większości prac badawczych analizom poddane były wartości wskaźników takich jak: moc szczytowa, moc średnia, moc maksymalna, VO₂max, czas wysiłku, dystans, liczba powtórzeń i odczucie zmęczenia (de Groot, Thijssen et al. 2010; Crisafulli, Tangianu et al. 2011; Patterson, Bezodis et al. 2015; Marocolo, Willardson et al. 2016). Mimo, iż powyższe wskaźniki sprawności fizycznej mogą stanowić cenne informacje aplikacyjne o efektach

stosowanych procedur IPC należy podkreślić, że nie mogą one wyjaśnić podłoża molekularnych zmian zachodzących wewnątrz organizmu w następstwie kontrolowanych epizodów niedokrwienia indukowanych wysiłkiem fizycznym. W dostępnym piśmiennictwie można odnaleźć prace badawcze zajmujące się odpowiedzią molekularną wynikającą z zastosowanej procedury IPC oraz RIPC, jednakże nie dotyczą one następstw wywołanych wysiłkiem fizycznym (Konstantinov, Li et al. 2005; Zhou, Zeng et al. 2010; Wei, Xin et al. 2011; Billah, Ridiandries et al. 2019). Ostatnie badania wpływu hartowania przez niedokrwienie obu kończyn dolnych na zmiany wewnątrzkomórkowe indukowane biegiem dalekodystansowym zostały udokumentowane w pracy Mieszkowski, Stankiewicz et al. (2020). Autorzy przebadali 24 biegaczy, amatorów rywalizujących w biegach długich na dystansie 42km. Biorąc pod uwagę zaobserwowany przez nich korzystny wpływ zastosowania 10 dniowej procedury hartowania przez niedokrwienie obu kończyn dolnych na poziom odpowiedzi komórkowej i tkankowej, nasuwa się również pytanie, czy oddziaływanie hartowania przez niedokrwienie może przyczynić się do powstania istotnych zmian przystosowawczych indukowanych maksymalnym wysiłkiem fizycznym na poziomie ogólnoustrojowym, jeśli wykonywane będzie tylko na jednej kończynie? Wychodząc z założenia kontrlateralnych efektów treningowych (Fermin, Larkins et al. 2018), zdalne hartowanie przez niedokrwienie jednej kończyny może mieć szczególne znaczenie w przypadku osób wykonujących wysiłek fizyczny jednostronnie, jak i również w przypadku osób trwale unieruchomionych, niezdolnych do aktywności fizycznej np. jednym ramieniem lub nogą.

W przedstawionym w rozprawie doktorskiej eksperymencie wpływu jednokrotnego oraz dziesięciodniowego zdalnego hartowania przez niedokrwienie pojedynczej kończyny dolnej na zmiany wewnątrzkomórkowe indukowane maksymalnym wysiłkiem anaerobowym poddano analizie wybrane markery biochemiczne mogące świadczyć o nasilonej odpowiedzi powysiłkowej. W pierwszej kolejności przeprowadzone analizy dotyczyły wpływu zastosowanych procedur zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej na zmiany stężenia kwasu mlekowego i glukozy indukowanych maksymalną próbą wysiłku anaerobowego. W eksperymencie jednorazowego zdalnego hartowania przez niedokrwienie odnotowany w grupie RIPC_{1x} istotnie większe stężenie kwasu mlekowego i glukozy we krwi 3 minuty po teście Wingate może sugerować zwiększone zapotrzebowanie organizmu na glukozę wynikające z nasilenia tempa przemian biochemicznych zaangażowanych w resyntezę ATP. Oprócz istotnych różnic międzygrupowych zanotowano również w grupie RIPC_{1x} istotny spadek stężenia kwasu mlekowego i glukozy pomiędzy 3 a 15 minutą poboru

krwi. Natomiast w grupie SHAM_{1x} wartości te utrzymywały się na podobnym poziomie. Uzyskane wyniki sugerują, że jednorazowa procedura zdalnego hartowania przez niedokrwienie, mimo iż nie miała istotnego związku z poprawą maksymalnych możliwości anaerobowych mogła wpłynąć na rozwinięcie mechanizmu adaptacji związanego z szybszą eliminacją powstającego podczas wysiłku fizycznego kwasu mlekowego oraz zwiększoną zdolnością do resyntezy ATP z glukozy (m.in. glikoliza beztlenowa oraz przemiany tlenowe), jaka może towarzyszyć wskutek sprinterskich treningów interwałowych (Thom, Kavaliauskas et al. 2020), czy też treningów progresywnych zwiększających procent maksymalnej prędkości aerobowej (Keir, Theriault et al. 2013). Nieco inaczej ukształtowały się zmiany stężenia kwasu mlekowego po dziesięciodniowej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej. Podczas gdy zauważono w grupie RIPC_{10x} tendencję wzrostową stężenia LA między 3 a 15 minutą pobrania krwi, w grupie SHAM_{10x} stężenie LA nieznacznie zmalało prowadząc do istotnej różnicy między grupami 15min po wysiłku. Wynik ten może mieć związek z istotnym zwiększeniem możliwości anaerobowych w grupie RIPC_{10x}, które najprawdopodobniej wynikają z przystosowania mechanizmów beztlenowego pozyskiwania energii i poprawy zdolności organizmu do kontynuowania wysiłku fizycznego przy narastającym stężeniu kwasu mlekowego. Taki charakter adaptacji może okazać się szczególnie istotny w sportach charakteryzujących się bardzo intensywnym wysiłkiem o krótkim czasie trwania.

W innych badaniach wpływ jednorazowej procedury hartowania przez niedokrwienie na zmiany kwasu mlekowego zanotowano w odpowiedzi po pięciokrotnym sprincie na ergometrze rowerowym (Gibson, Mahony et al. 2015). Interesujący może wydawać się fakt, że na skutek przeprowadzonej procedury jednorazowego hartowania przez niedokrwienie przed pięcioma 6 sekundowymi sprintami (z przerwą 24 sekundową) stężenia kwasu mlekowego wśród kobiet po wykonanej próbie wysiłkowej okazały się istotnie niższe w porównaniu do mężczyzn, przy czym możliwości wysiłkowe nie uległy poprawie w obu grupach. „Stłumiona” odpowiedź mleczanowa przy utrzymaniu tych samych możliwości wysiłkowych może sugerować większy udział metabolizmu tlenowego z oszczędnym udziałem ATP generowanym w procesie glikolizy (Bailey, Jones et al. 2012).

Nie wszystkie jednak prace potwierdziły istotny wpływ IPC lub RIPC na zmiany poziomu kwasu mlekowego indukowanego wysiłkiem fizycznym. W kilku publikacjach nie wykazano istotnych zmian poziomu kwasu mlekowego wskutek zastosowanej procedury hartowania przez niedokrwienie indukowanych wysiłkiem fizycznym (de Groot, Thijssen et al. 2010; Crisafulli, Tangianu et al. 2011; Jean-St-Michel, Manlhiot et al. 2011; Bailey, Jones

et al. 2012; Clevidence, Mowery et al. 2012; Paixao, da Mota et al. 2014; Patterson, Bezodis et al. 2015; Marocolo, Willardson et al. 2016). Należy nadmienić, że wymienione badania opierały się jedynie o jednorazowe sesje hartowania przez niedokrwienie na kończynach górnych lub dolnych oraz odmiennych procedurach. Natomiast wyniki stężenia mleczanu uzyskiwane były po różnych próbach wysiłku fizycznego.

W dalszej części pracy przeprowadzono analizę zmian wartości parametrów biochemicznych związanych z czynnością sekrecyjną tkanek (FSTL-1, GDF-15 i TIMP-1, ANG, ANGTP1, BDNF, IL-6, IL-10, IL-15, LIF, OSM) w związku z: odpowiedzią na maksymalny wysiłek anaerobowy, jednorazową oraz 10 dniową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie, jak również jednorazową i 10 dniową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie indukowaną maksymalnym wysiłkiem anaerobowym.

Faktem jest, że reaktywność wybranych markerów biochemicznych może być odmienna a ich zmienność między innymi prawie zawsze będzie zależna od siły bodźca oddziałującego na ciało, jak również poziomu przystosowania organizmu.

Zaobserwowany w badaniach istotny wpływ maksymalnego wysiłku anaerobowego na zmiany poziomu wybranych markerów stanu zapalnego takich jak GDF-15, TIMP-1, FSTL-1 jest analogiczny z wynikami Antosiewicz, Kaczor et al. (2013) i Mieszkowski, Stankiewicz et al. (2020), co może sugerować to, że charakter granicznego wysiłku fizycznego, jakim jest 30 sekundowy Wingate test, aktywował szereg mechanizmów wewnątrzustrojowych, wywołując nasilenie procesów zapalnych na skutek uszkodzenia tkanek poddanych wysiłkowi (Kochanowicz, Sawczyn et al. 2017).

Warunkiem koniecznym do zbadania wpływu jednorazowej i 10 dniowej procedury zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej na zmiany markerów stanu zapalnego indukowanych maksymalnym wysiłkiem anaerobowym było wykonanie odrębnej analizy oceniającej sam wpływ jednorazowej i 10 dniowej procedury zdalnego hartowania przez niedokrwienie na poziom wybranych markerów w surowicy krwi z wyłączeniem dodatkowego czynnika jakim jest wysiłek fizyczny. Przeprowadzone badania nie wykazały jednak istotnego wpływu samej procedury RIPC zarówno dla jednorazowego, jak i 10 dniowego zdalnego hartowania przez niedokrwienie, co może sugerować, że zastosowanie obu procedur RIPC jednej kończyny dolnej okazało się niewystarczająco silnym bodźcem mogącym wywołać istotne zmiany w badanych markerach biochemicznych. Mimo iż uzyskane wyniki nie pozwalają stwierdzić istotnego wpływu zastosowanych procedur zdalnego hartowania przez niedokrwienie na funkcję wydzielniczą tkanek w warunkach spoczynkowych, należy nadmienić, że jest to pierwsza praca, w której szczegółowo poddano

analizie wpływ samych procedur oddziaływania bodźca jakim jest zdalne hartowanie przez niedokrwienie kończyny dolnej na poziom czynności wydzielniczej tkanek.

Kolejnym etapem badań była ocena wpływu pojedynczej procedury zdalnego hartowania przez niedokrwienie na poziom badanych białek indukowanych maksymalnym wysiłkiem anaerobowym. Zaobserwowane w obu grupach odmienne trendy zmian ANG między 60 a 120 minutą po wysiłku spowodowały w grupie $RIPC_{1x}$ istotnie niższe wartości stężenia w porównaniu z grupą $SHAM_{1x}$.

Zgodnie z aktualną wiedzą angiogenina dzięki swojej specyficznej budowie wykazuje zdolności pobudzania śródbłónka naczyniowego do tworzenia nowych naczyń krwionośnych i indukuje proces neowaskularyzacji. Należy nadmienić, że specyfika tego działania jest związana z apoptotyczną lub nekrotyczną śmiercią innych komórek (Kimura, Ueda et al. 2007). W przypadku osób poddanych jednorazowemu zdalnemu hartowaniu przez niedokrwienie z uciskiem 220 mmHg zanotowany spadek ANG z dużą dawką prawdopodobieństwa może sugerować, że w wyniku maksymalnego wysiłku anaerobowego tempo apoptozy i nekrozy komórek pochodzących z uszkodzonych tkanek jest obniżone, a co za tym idzie, stężenie substratów dla czynników proangigennych będzie niższe. W badaniu wpływu jednorazowej procedury zdalnego hartowania przez niedokrwienie na zmiany stężenia inhibitora metaloproteinaz z grupy TIMP indukowanego maksymalnym wysiłkiem zauważono odwrotną zależność. Podczas gdy zanotowano niewielki wzrost stężenia TIMP-1 w grupie $RIPC_{1x}$ 60min po wysiłku, w grupie $SHAM_{1x}$ zauważono istotny spadek, który spowodował istotną różnicę między grupami. Trzeba podkreślić, że rola angiogeniczna TIMP-1 nie ogranicza się jedynie do wpływu regulacyjnego aktywności samych metaloproteaz. Poprzez swoje funkcje może indukować on zwiększoną proliferację, ale również działać antyapoptotyczne na inne komórki, regulując między innymi procesy angiogenezy (Stetler-Stevenson 2008; Ries 2014). Tak więc zaobserwowany brak spadku stężenia TIMP1 w odpowiedzi na wysiłek po jednorazowym zdalnym hartowaniu przez niedokrwienie w stosunku do $SHAM_{1x}$ może być korzystny i przełożyć się na wzrost przeżywalności komórek poddanych maksymalnemu wysiłkowi anaerobowemu.

Istotny wpływ pojedynczej procedury zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej indukowanej 30s testem Wingate zauważono również w różnicującym czynniku wzrostu, który wykazał istotny wzrost w grupie $SHAM_{1x}$ 60min po wysiłku w przeciwieństwie do grupy $RIPC_{1x}$. Biorąc pod uwagę rolę GDF-15 jako biomarkera sygnalizującego stan zapalny, niedokrwienie mięśnia sercowego czy też choroby nowotworowe, uzyskane wyniki mogą świadczyć o właściwościach ochronnych pojedynczej

procedury zdalnego hartowania przez niedokrwienie, zmniejszając stres związany z ryzykiem sercowo-naczyniowym (Galliera, Lombardi et al. 2014) oraz skutkami uszkodzenia mięśni szkieletowych w wyniku maksymalnego wysiłku aerobowego (Gil, Ost et al. 2019).

Równie interesujące z punktu widzenia korzyści stosowania procedury RIPC było zbadanie wpływu 10 dniowego zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej na zmiany badanych markerów indukowanych maksymalnym wysiłkiem anaerobowym. Zmiany poziomów wybranych markerów stanu zapalnego w surowicy krwi indukowanych 30s testu Wingate po zastosowaniu 10 dniowej procedury zdalnego hartowania przez niedokrwienie w przypadku ANG i TIMP-1 potwierdziły, a nawet uwypukliły zaobserwowane wcześniej różnice międzygrupowe dla jednorazowego RIPC. Badanie procedury dziesięciodniowego zdalnego hartowania przez niedokrwienie indukowanego maksymalnym wysiłkiem anaerobowym wykazało, że podczas gdy nastąpił w grupie SHAM_{10x} istotny wzrost stężenia ANG 120min po wysiłku, w grupie RIPC_{10x} zanotowano nieznaczny spadek. W wyniku powyższych zmian, w grupie RIPC_{10x} odnotowano istotnie niższy poziom stężenia ANG w porównaniu do grupy SHAM_{10x}. Porównywalne wyniki analiz w przeprowadzonych eksperymentach zdalnego hartowania przez niedokrwienie można zaobserwować również w przypadku TIMP-1. Sześćdziesiąt minut po zakończeniu wysiłku fizycznego istotnie wyższy poziom stężenia TIMP-1 zaobserwowano w grupie RIPC_{10x} niż w grupie SHAM_{10x}. Tak jak w eksperymencie jednorazowego zdalnego hartowania przez niedokrwienie, pomimo trendu spadkowego stężenia TIMP-1 zanotowanego 60min po wysiłku w obu grupach, zmiana w grupie SHAM_{10x} była istotna w porównaniu do nieznacznego spadku w grupie RIPC_{10x}. Wynik ten może sugerować, efekt specyficznych zmian przystosowawczych po zastosowaniu 10 dniowej procedury zdalnego hartowania przez niedokrwienie z zaciskiem uda na poziomie 220 mmHg. Warto również nadmienić, że sam tkankowy inhibitor metaloproteinazy, bierze udział w rozwoju tkanki mięśni szkieletowych i procesach naprawczych wynikających z urazów mięśni (Madden, Byrnes et al. 2011; Alameddine 2012). Może również sprzyjać ich regeneracji i rozwojowi, co z punktu widzenia pracy mięśnia jest bardzo korzystne. Zachwianie jego stężenia w surowicy krwi i wyraźny jego spadek z całą pewnością może przełożyć się na różnorodne konsekwencje somatyczne, polegające między innymi na zwiększeniu prawdopodobieństwa wystąpienia urazów w przyszłości (Lo Presti, Hopps et al. 2017).

Na uwagę zasługuje również istotny wpływ 10 dniowej procedury zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej na zmiany stężenia IL-6 indukowane 30s Wingate test. Zaobserwowana 120 min po wysiłku tendencja wzrostowa stężenia IL-6 w grupie SHAM_{10x}

oraz tendencja malejąca w grupie $RIPC_{10x}$ może sugerować korzystny efekt przystosowania 10 dniowej procedury zdalnego hartowania przez niedokrwienie, mimo iż sam efekt czynnika stanowiącego maksymalny wysiłek anaerobowy był nie istotny. Ponadto brak istotnego wzrostu IL-10 i OSM po 30s Wingate Test na każdym etapie badań może wynikać z niedostatecznego synergistycznego oddziaływania przeciwzapalnego w stosunku do IL-6 i LIF. Interleukina 6 jako jedna z cytokin zaangażowanych w regulację procesu zapalnego w sposób istotny przyczynia się do jego nasilenia. Jej wzrost przekłada się na regulację samej odpowiedzi zapalnej, a co za tym idzie wzrost poziomu uszkodzenia tkanek poddanych wysiłkowi fizycznemu.

Wcześniejsze badania Mieszkowski, Stankiewicz et al. (2020) wykazały także korzystny wpływ stosowanej procedury hartowania na zmiany parametrów IL-6 i TIMP-1. Ponadto wyniki badań eksperymentalnych wykazały również istotnie mniejszy wzrost stężenia IL-6 i rezystyny w surowicy krwi pobranej bezpośrednio po zakończeniu biegu maratońskiego u biegaczy, którzy wykonali 24 godziny przed startem 10 dniową procedurę hartowania przez niedokrwienie obu kończyn dolnych. Interesujące jest, że sama procedura 10 dniowego hartowania przez niedokrwienie zarówno w grupie IPC, jak i SHAM tak samo nie wywołała istotnych zmian w badanych markerach. Nie mniej jednak, w przytoczonym badaniu udowodniono po raz pierwszy, że dziesięciodniowy IPC zastosowany na obu kończynach dolnych znacząco wpływa na zmianę poziomu cytokin w surowicy krwi indukowanych biegiem maratońskim. Wyniki tych badań są potwierdzeniem przypuszczeń, że wielokrotne hartowanie przez niedokrwienie na przykładzie 10 dniowej procedury IPC może skutecznie zredukować stan zapalny wywołany długotrwałym wysiłkiem fizycznym, a tym samym sprzyjać działaniu kaskad metabolicznych odpowiadających za równowagę prozapalno-przeciwzapalnej (Mieszkowski, Stankiewicz et al. 2020). Warto jednak nadmienić, że w tym przypadku siła działania bodźca była znacznie większa przez wzgląd na zastosowaną procedurę hartowania przez niedokrwienie wykonaną na obu kończynach dolnych, jak również czas trwania i charakter wysiłku.

Brak efektu adaptacji dla GDF-15 wskutek zastosowania 10 dniowej procedury zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej indukowanej 30s Wingate testem może wynikać z trwałości zastosowanego bodźca. W przypadku jednorazowej procedury zdalnego hartowania przez niedokrwienie 30s Wingate test wykonywany był po 60 minutach od zakończenia ostatniego zacisku. z kolei po 10 dniowej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie maksymalny wysiłek anaerobowy wykonywano po 24 godzinach od

zakończenia ostatniej sesji, co dla GDF-15 mogło stanowić zbyt oddalony czas na wykazanie zróżnicowanej odpowiedzi powysiłkowej.

Reasumując, niniejsza praca jest próbą kompleksowej i wieloetapowej analizy wpływu zarówno pojedynczej, jak również 10 dniowej procedury zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej na funkcję tkanek poddanych maksymalnemu anaerobowemu wysiłkowi. Analiza uzyskanych wyników nie wykazała wpływu samego zdalnego hartowania przez niedokrwienie pojedynczej kończyny dolnej na zmiany parametrów biochemicznych, jednakże zmiany te były istotne w zakresie poprawy parametrów fizjologicznych, jak również wewnątrzkomórkowej odpowiedzi na zadany wysiłek. Należy nadmienić, że zaobserwowane zmiany przystosowawcze ANG, GDF-15 i TIMP-1 indukowane maksymalnym wysiłkiem anaerobowym po zastosowaniu pojedynczej procedury zdalnego hartowania przez niedokrwienie oraz analogiczne zmiany ANG, IL-6 i TIMP-1 po zastosowaniu dziesięciodniowej procedury zdalnego hartowania przez niedokrwienie nie pozwalają w pełni ocenić ich rozległości. Z drugiej strony odnotowany w ANGTP1, BDNF, IL-10, IL-15 i OSM brak efektu wysiłkowego oraz grupowego w przeprowadzonych eksperymentach badawczych może wynikać z nieadekwatnego obciążenia wysiłkowego czy też małej liczby oraz dość wczesnych punktów poborów krwi po 30s teście Wingate. Biorąc pod uwagę wszystkie badane markery stanu zapalnego ograniczenie to przez wzgląd na założone hipotezy oraz dużą zbieżność wyników z innymi autorami nie wpływa znacząco na możliwości interpretacji wyników oraz sformułowania wniosków. Z całą pewnością uzyskane wyniki badań dowodzą skuteczności zastosowanych procedur zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej w prewencji uszkodzenia tkanek indukowanych maksymalnym wysiłkiem beztlenowym, a co przekłada się na poprawę ich funkcji. Procedura zdalnego hartowania przez niedokrwienie może stanowić ważny środek treningowy w profilaktyce urazów, fizjoterapii jak również rywalizacji sportowej. Jednorazowa i dziesięciodniowa procedura może stanowić również uzupełnienie dla stosowanych i uznanych już metod oddziaływania na tkanki bądź narządy w naukach o zdrowiu i kulturze fizycznej.

V WNIOSKI

Na podstawie przeprowadzonych badań nad wpływem zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej na zmiany wybranych markerów stanu zapalnego indukowanych maksymalnym wysiłkiem anaerobowym opracowano następujące wnioski:

1. Jednorazowa procedura zdalnego hartowania przez niedokrwienie z zaciskiem 220 mmHg wiodącej kończyny dolnej nie wykazała istotnego wpływu na zmianę poziomu maksymalnych możliwości anaerobowych w 30s Wingate Test.
2. Dziesięciodniowa procedura zdalnego hartowania przez niedokrwienie z zaciskiem 220 mmHg wiodącej kończyny dolnej wykazała istotny wpływ na poprawę możliwości anaerobowych w 30s Wingate Test.
3. Zarówno jednorazowa, jak i dziesięciodniowa procedura zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej wykazała odmienny wpływ na zmiany kwasu mlekowego i glukozy indukowanego maksymalnym wysiłkiem anaerobowym. W przypadku osób poddanych jednorazowej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie z zaciskiem 220 mmHg zastosowany 30s Wingate Test wywołał istotnie większy poziom stężenia kwasu mlekowego i glukozy we krwi 3 minuty po WAnT oraz istotny spadek 15 minut po wysiłku w porównaniu do grupy z zaciskiem 20 mmHg. Z kolei w przypadku osób poddanych dziesięciodniowej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej z zaciskiem 220 mmHg zastosowany 30s Wingate Test wywołał wzrost stężenia kwasu mlekowego, powodując istotnie wyższy poziom 15 min po wysiłku w porównaniu do grupy z zaciskiem 20 mmHg.
4. Pomimo braku efektów samego jednorazowego i dziesięciodniowego zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej na zmiany wybranych parametrów biochemicznych, ich wpływ jest istotny w odpowiedzi na maksymalny wysiłek anaerobowy.

5. Jednorazowa procedura zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej o zacisku 220 mmHg hamuje wzrost ANG i GDF-15 oraz spadek TIMP-1 indukowanego maksymalnym wysiłkiem anaerobowym w stosunku do grupy wykonującej zacisk uda na poziomie 20 mmHg.
6. Dziesięciodniowa procedura zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej o zacisku 220 mmHg wpływa na hamowanie wzrostu ANG i IL-6 oraz spadku TIMP-1 indukowanego maksymalnym, wysiłkiem anaerobowym w stosunku do grupy wykonującej zacisk uda na poziomie 20 mmHg.
7. Istotny wpływ zastosowanych procedur zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej na zmiany stężeń ANG, GDF-15, TIMP-1 oraz IL-6 indukuje szereg działań ochronnych na tkanki poddane maksymalnemu wysiłkowi anaerobowemu.
8. Odnotowany brak efektu wysiłkowego i grupowego w ANGTP1, BDNF, IL-10, IL-15 i OSM w przeprowadzonych eksperymentach badawczych może wynikać z nieadekwatnego obciążenia wysiłkowego, czy też dość wczesnych punktów poborów krwi po 30s Wingate Test.

Streszczenie

Wpływ zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej na zmiany wybranych markerów stanu zapalnego indukowanych maksymalnym wysiłkiem anaerobowym

Wstęp: Zdalne hartowanie przez niedokrwienne (RIPC) jest to stosunkowo nowa procedura treningowa ciesząca się rosnącym zainteresowaniem w świecie nauk o kulturze fizycznej. Z uwagi na wiele korzystnych efektów w zakresie natlenienia mięśni, unaczynienia i zwiększenia przepływu krwi do aktywnych tkanek i narządów, procedury RIPC poddano również analizom wpływu na możliwości wysiłkowe człowieka. Dlatego też użyteczność stosowania procedur RIPC oraz warunki jej wykonania wymagają dalszych badań.

Cel pracy: Wykazanie wpływu jednorazowej oraz 10-dniowej procedury RIPC na poziom możliwości anaerobowych oraz nasilenie stanu zapalnego w wyniku maksymalnego wysiłku fizycznego.

Material i metody: W badaniach eksperymentalnych, w których wzięło udział 40 zdrowych, aktywnych fizycznie mężczyzn w wieku $19,98 \pm 1,17$ lat przeprowadzono jednorazową i 10 dniową procedurę zdalnego hartowania przez niedokrwienie polegającą na czterech cyklach okluzji i reperfuzji trwających po 5 minut z zaciskiem kołnierza sfigonomometrycznego na poziomie 220 mmHg w grupie RIPC oraz 20 mmHg w grupie SHAM. Każdorazowo przed i po wykonanym eksperymencie wszystkim uczestnikom wykonano badanie składu ciała oraz test maksymalnej mocy beztlenowej (Winagate Test). Ocenie poddano zmiany parametrów fizjologicznych uzyskiwanych w próbach wysiłkowych jak i zmiany stężenia wybranych markerów stanu zapalnego zarówno po jednorazowej, jak również przed i po 10 dniowej procedurze RIPC. Charakter zmian oceniono za pomocą dwukierunkowej analizy wariancji ANOVA z powtarzanymi pomiarami.

Wyniki: Tylko w przypadku zastosowania 10 dniowego treningu RIPC zaobserwowano istotny wzrost mocy średniej (4,81% ($p < 0,05$)) oraz mocy szczytowej (4,79% ($p < 0,05$)). Analiza parametrów biochemicznych wykazała, że wykonanie jednorazowej procedury RIPC poprzedzającej maksymalny wysiłek anaerobowy przyczynia się do zahamowania wydzielania ANG i GDF-15 oraz spadku TIMP-1 w surowicy krwi. Dziesięciodniowa procedura RIPC obniża poziom ANG i IL-6 oraz dodatkowo przyczynia się do zmniejszenia spadku stężenia TIMP-1. Nie wykazano jednak wpływu zarówno jednorazowej, jak i 10 dniowej procedury RIPC na wyjściowe stężenia wybranych markerów stanu zapalnego oraz uszkodzenia mięśni.

Wnioski: Zastosowanie 10 dniowego treningu RIPC wpływa istotnie na wyniki wydolności anaerobowej oraz zmiany stężenia ANG, IL-6 i TIMP-1 w surowicy krwi, wywołując efekt ochronny przed uszkodzeniami mięśni wywołanymi ćwiczeniami fizycznymi.

Abstract

The effect of remove ischemic preconditioning by lower limb on changes in selected inflammation markers induced by maximal anaerobic effort

Introduction: Remote ischemic preconditioning (RIPC) is a relatively new technique, benefitting from a growing interest among those in the world of sports medicine. Due to the beneficial effects of this technique on muscle oxygenation, blood flow delivery, angiogenesis, inflammation and apoptosis attenuation, the RIPC procedures have been assessed in regards to their influence on a person's capacity for physical exercise. Therefore, the specificity of this technique (how it should be carried out, size and the number of the treated tissues, number of cycles, etc.) requires further experimentation.

Aim of the study: Elucidation of the effects of one-time and 10-day remove ischemic preconditioning training on WAnT Test induced changes in biochemical markers of inflammation process and muscle damage.

Material and Methods: Forty healthy, physically active men of the age group $19,98 \pm 1,17$ years old performed one day and ten days of RIPC training in the course of four cycles, by inflating and deflating a blood pressure cuff to a pressure of 220 mmHg at 5-min intervals. The SHAM procedure consisted of the same number of cycles but the inflation pressure was 20 mmHg. Either way, before and after the experiment was carried out, body composition tests and peak anaerobic power tests (Wingate Tests) were administered to all 40 subjects. Changes in physiological parameters, obtained in exercise tests, as well as changes in the concentration of selected markers of inflammation, both after a one-time RIPC procedure, as well as before and after the 10-day RIPC procedure, were assessed. The extent of before-and-after differences between levels of inflammation process and muscle damage markers after RIPC and SHAM training were assessed using two-way ANOVA with repeated measurements.

Results: The one-time RIPC procedure did not affect WAnT performance. On the other hand, it was shown that the 10-day RIPC procedure significantly increased mean power (4,81% ($p < 0.05$)), and peak power (4,79% ($p < 0.05$)). Furthermore, one-time RIPC inhibits the secretion of serum ANG and GDF-15 and reduces the fall of TIMP-1 in response to the maximal anaerobic Wingate Test. Similarly to the one-time procedure, the 10-day RIPC training decreases serum levels of ANG and IL 6 and also decreases the fall in TIMP-1 levels. One-time and 10-day RIPC training did not affect baseline serum levels of muscle damage and inflammation process markers.

Conclusion: The 10-day RIPC procedure influences the results of the Wingate Anaerobic test. Furthermore, the ten days of RIPC training significantly affected serum level of ANG, IL-6 and TIMP-1, inducing a protective effect against exercise-induced muscle damage.

Piśmiennictwo

- Addison, P. D., P. C. Neligan, et al. (2003). "Noninvasive remote ischemic preconditioning for global protection of skeletal muscle against infarction." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285(4): H1435-1443.
- Akira, S. and K. Takeda (2004). "Toll-like receptor signalling." *Nat Rev Immunol* 4(7): 499-511.
- Akwii, R. G., M. S. Sajib, et al. (2019). "Role of Angiopoietin-2 in Vascular Physiology and Pathophysiology." *Cells* 8(5).
- Alameddine, H. S. (2012). "Matrix metalloproteinases in skeletal muscles: friends or foes?" *Neurobiol Dis* 48(3): 508-518.
- Antosiewicz, J., J. J. Kaczor, et al. (2013). "Repeated "all out" interval exercise causes an increase in serum hepcidin concentration in both trained and untrained men." *Cell Immunol* 283(1-2): 12-17.
- Ayalon, A., O. Inbar, et al. (1974). "Relationships Among measurements of explosive strength and anaerobic power." *Biomechanics IV*: 572-577.
- Bailey, T. G., H. Jones, et al. (2012). "Effect of ischemic preconditioning on lactate accumulation and running performance." *Med Sci Sports Exerc* 44(11): 2084-2089.
- Bar-Or, O. (1987). "The Wingate anaerobic test. An update on methodology, reliability and validity." *Sports Med* 4(6): 381-394.
- Barbalho, S. M., E. V. Prado Neto, et al. (2020). "Myokines: a descriptive review." *J Sports Med Phys Fitness* 60(12): 1583-1590.
- Barbosa, T. C., A. C. Machado, et al. (2015). "Remote ischemic preconditioning delays fatigue development during handgrip exercise." *Scand J Med Sci Sports* 25(3): 356-364.
- Bauer, E. A., G. P. Stricklin, et al. (1975). "Collagenase production by human skin fibroblasts." *Biochem Biophys Res Commun* 64(1): 232-240.
- Beaven, C. M., C. J. Cook, et al. (2012). "Intermittent lower-limb occlusion enhances recovery after strenuous exercise." *Appl Physiol Nutr Metab* 37(6): 1132-1139.
- Billah, M., A. Ridiandries, et al. (2019). "Circulating mediators of remote ischemic preconditioning: search for the missing link between non-lethal ischemia and cardioprotection." *Oncotarget* 10(2): 216-244.
- Billah, M., A. Ridiandries, et al. (2020). "Remote Ischemic Preconditioning induces Cardioprotective Autophagy and Signals through the IL-6-Dependent JAK-STAT Pathway." *Int J Mol Sci* 21(5).
- Birnbaum, Y., S. L. Hale, et al. (1997). "Ischemic preconditioning at a distance: reduction of myocardial infarct size by partial reduction of blood supply combined with rapid stimulation of the gastrocnemius muscle in the rabbit." *Circulation* 96(5): 1641-1646.
- Bootcov, M. R., A. R. Bauskin, et al. (1997). "MIC-1, a novel macrophage inhibitory cytokine, is a divergent member of the TGF-beta superfamily." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(21): 11514-11519.
- Botker, H. E., R. Kharbanda, et al. (2010). "Remote ischaemic conditioning before hospital admission, as a complement to angioplasty, and effect on myocardial salvage in patients with acute myocardial infarction: a randomised trial." *Lancet* 375(9716): 727-734.
- Botker, H. E., T. R. Lassen, et al. (2018). "Clinical translation of myocardial conditioning." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 314(6): H1225-H1252.
- Brandt, C. and B. K. Pedersen (2010). "The role of exercise-induced myokines in muscle homeostasis and the defense against chronic diseases." *J Biomed Biotechnol* 2010: 520258.
- Broholm, C., M. J. Laye, et al. (2011). "LIF is a contraction-induced myokine stimulating human myocyte proliferation." *J Appl Physiol* (1985) 111(1): 251-259.
- Broholm, C. and B. K. Pedersen (2010). "Leukaemia inhibitory factor--an exercise-induced myokine." *Exerc Immunol Rev* 16: 77-85.
- Bruserud, O., F. Grovan, et al. (2005). "Serum levels of angioregulatory mediators in healthy individuals depend on age and physical activity: studies of angiogenin, basic fibroblast growth factor, leptin and endostatin." *Scand J Clin Lab Invest* 65(6): 505-511.

- Burgomaster, K. A., D. R. Moore, et al. (2003). "Resistance training with vascular occlusion: metabolic adaptations in human muscle." *Med Sci Sports Exerc* 35(7): 1203-1208.
- Bushell, A. J., L. Klenerman, et al. (2002). "Ischaemic preconditioning of skeletal muscle. 1. Protection against the structural changes induced by ischaemia/reperfusion injury." *J Bone Joint Surg Br* 84(8): 1184-1188.
- Cannon, J. G. and M. J. Kluger (1983). "Endogenous pyrogen activity in human plasma after exercise." *Science* 220(4597): 617-619.
- Carbo, N., J. Lopez-Soriano, et al. (2001). "Interleukin-15 mediates reciprocal regulation of adipose and muscle mass: a potential role in body weight control." *Biochim Biophys Acta* 1526(1): 17-24.
- Caru, M., A. Levesque, et al. (2019). "An overview of ischemic preconditioning in exercise performance: A systematic review." *J Sport Health Sci* 8(4): 355-369.
- Carvalho, L. and R. Barroso (2019). "Ischemic Preconditioning Improves Strength Endurance Performance." *J Strength Cond Res* 33(12): 3332-3337.
- Chaly, Y., B. Hostager, et al. (2014). "Follistatin-like protein 1 and its role in inflammation and inflammatory diseases." *Immunol Res* 59(1-3): 266-272.
- Chen, W. F. and A. Zlotnik (1991). "IL-10: a novel cytotoxic T cell differentiation factor." *J Immunol* 147(2): 528-534.
- Cheng, C. F., Y. H. Kuo, et al. (2021). "Local and Remote Ischemic Preconditioning Improves Sprint Interval Exercise Performance in Team Sport Athletes." *Int J Environ Res Public Health* 18(20).
- Cheung, C. P., J. T. Slys, et al. (2019). "Ischemic Preconditioning: Improved Cycling Performance Despite Nocebo Expectation." *Int J Sports Physiol Perform*: 1-7.
- Clevidence, M. W., R. E. Mowery, et al. (2012). "The effects of ischemic preconditioning on aerobic and anaerobic variables associated with submaximal cycling performance." *Eur J Appl Physiol* 112(10): 3649-3654.
- Content, J., L. De Wit, et al. (1982). "Secretory proteins induced in human fibroblasts under conditions used for the production of interferon beta." *Proc Natl Acad Sci U S A* 79(9): 2768-2772.
- Crisafulli, A., F. Tangianu, et al. (2011). "Ischemic preconditioning of the muscle improves maximal exercise performance but not maximal oxygen uptake in humans." *J Appl Physiol* (1985) 111(2): 530-536.
- Cruz, R. S., R. A. de Aguiar, et al. (2015). "Effects of ischemic preconditioning on maximal constant-load cycling performance." *J Appl Physiol* (1985) 119(9): 961-967.
- Cush, J. J., J. B. Splawski, et al. (1995). "Elevated interleukin-10 levels in patients with rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum* 38(1): 96-104.
- da Silva Novaes, J., L. G. da Silva Telles, et al. (2020). "Ischemic Preconditioning Improves Resistance Training Session Performance." *J Strength Cond Res*.
- de Groot, P. C., D. H. Thijssen, et al. (2010). "Ischemic preconditioning improves maximal performance in humans." *Eur J Appl Physiol* 108(1): 141-146.
- de Jong, G. M., J. J. Slager, et al. (2016). "Systematic review of the role of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 in Plasmodium species infections: biomarkers or therapeutic targets?" *Malar J* 15(1): 581.
- De Rossi, M., P. Bernasconi, et al. (2000). "Cytokines and chemokines are both expressed by human myoblasts: possible relevance for the immune pathogenesis of muscle inflammation." *Int Immunol* 12(9): 1329-1335.
- Desmedt, S., V. Desmedt, et al. (2019). "Growth differentiation factor 15: A novel biomarker with high clinical potential." *Crit Rev Clin Lab Sci* 56(5): 333-350.
- Eleuteri, E., A. Mezzani, et al. (2013). "Aerobic training and angiogenesis activation in patients with stable chronic heart failure: a preliminary report." *Biomarkers* 18(5): 418-424.
- Enko, K., K. Nakamura, et al. (2011). "Intermittent arm ischemia induces vasodilatation of the contralateral upper limb." *J Physiol Sci* 61(6): 507-513.

- Fermin, S., L. Larkins, et al. (2018). "The Effect of Contralateral Exercise on Patient Pain and Range of Motion." *J Sport Rehabil* 27(2): 185-188.
- Fett, J. W., D. J. Strydom, et al. (1985). "Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells." *Biochemistry* 24(20): 5480-5486.
- Finkelstein, D. I., P. F. Bartlett, et al. (1996). "Leukemia inhibitory factor is a myotrophic and neurotrophic agent that enhances the reinnervation of muscle in the rat." *J Neurosci Res* 46(1): 122-128.
- Fiorentino, D. F., M. W. Bond, et al. (1989). "Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones." *J Exp Med* 170(6): 2081-2095.
- Foster, G. P., P. C. Giri, et al. (2014). "Ischemic preconditioning improves oxygen saturation and attenuates hypoxic pulmonary vasoconstriction at high altitude." *High Alt Med Biol* 15(2): 155-161.
- Foster, G. P., D. E. Westerdahl, et al. (2011). "Ischemic preconditioning of the lower extremity attenuates the normal hypoxic increase in pulmonary artery systolic pressure." *Respir Physiol Neurobiol* 179(2-3): 248-253.
- Fuster, G., S. Busquets, et al. (2009). "PPARdelta mediates IL15 metabolic actions in myotubes: effects of hyperthermia." *Int J Mol Med* 24(1): 63-68.
- Galliera, E., G. Lombardi, et al. (2014). "Acute exercise in elite rugby players increases the circulating level of the cardiovascular biomarker GDF-15." *Scand J Clin Lab Invest* 74(6): 492-499.
- Gao, X. and Z. Xu (2008). "Mechanisms of action of angiogenin." *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 40(7): 619-624.
- Gaspar, A., A. P. Lourenco, et al. (2018). "Randomized controlled trial of remote ischaemic conditioning in ST-elevation myocardial infarction as adjuvant to primary angioplasty (RIC-STEMI)." *Basic Res Cardiol* 113(3): 14.
- Gauldie, J., C. Richards, et al. (1987). "Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(20): 7251-7255.
- George, M., A. Jena, et al. (2016). "GDF 15--A Novel Biomarker in the Offing for Heart Failure." *Curr Cardiol Rev* 12(1): 37-46.
- Gibson, A. L., J. C. Holmes, et al. (2008). "Ability of new octapolar bioimpedance spectroscopy analyzers to predict 4-component-model percentage body fat in Hispanic, black, and white adults." *Am J Clin Nutr* 87(2): 332-338.
- Gibson, N., B. Mahony, et al. (2015). "Effect of ischemic preconditioning on repeated sprint ability in team sport athletes." *J Sports Sci* 33(11): 1182-1188.
- Gil, C. I., M. Ost, et al. (2019). "Role of GDF15 in active lifestyle induced metabolic adaptations and acute exercise response in mice." *Sci Rep* 9(1): 20120.
- Go, N. F., B. E. Castle, et al. (1990). "Interleukin 10, a novel B cell stimulatory factor: unresponsiveness of X chromosome-linked immunodeficiency B cells." *J Exp Med* 172(6): 1625-1631.
- Gomarasca, M., G. Banfi, et al. (2020). "Myokines: The endocrine coupling of skeletal muscle and bone." *Adv Clin Chem* 94: 155-218.
- Grant, S. L. and C. G. Begley (1999). "The oncostatin M signalling pathway: reversing the neoplastic phenotype?" *Mol Med Today* 5(9): 406-412.
- Griffin, P. J., L. Hughes, et al. (2019). "Effects of local versus remote ischemic preconditioning on repeated sprint running performance." *J Sports Med Phys Fitness* 59(2): 187-194.
- Grunwald, B., B. Schoeps, et al. (2019). "Recognizing the Molecular Multifunctionality and Interactome of TIMP-1." *Trends Cell Biol* 29(1): 6-19.
- Harcourt, L. J., J. D. Schertzer, et al. (2007). "Low dose formoterol administration improves muscle function in dystrophic mdx mice without increasing fatigue." *Neuromuscul Disord* 17(1): 47-55.
- Hausenloy, D. J. and D. M. Yellon (2008). "Remote ischaemic preconditioning: underlying mechanisms and clinical application." *Cardiovasc Res* 79(3): 377-386.

- He, F. F., D. Zhang, et al. (2019). "Angiopoietin-Tie signaling in kidney diseases: an updated review." *FEBS Lett* 593(19): 2706-2715.
- Heinrich, P. C., I. Behrmann, et al. (1998). "Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway." *Biochem J* 334 (Pt 2): 297-314.
- Hermanns, H. M. (2015). "Oncostatin M and interleukin-31: Cytokines, receptors, signal transduction and physiology." *Cytokine Growth Factor Rev* 26(5): 545-558.
- Hilton, D. J., N. A. Nicola, et al. (1988). "Purification of a murine leukemia inhibitory factor from Krebs ascites cells." *Anal Biochem* 173(2): 359-367.
- Hittinger, E. A., J. L. Maher, et al. (2015). "Ischemic preconditioning does not improve peak exercise capacity at sea level or simulated high altitude in trained male cyclists." *Appl Physiol Nutr Metab* 40(1): 65-71.
- Hojman, P., C. Dethlefsen, et al. (2011). "Exercise-induced muscle-derived cytokines inhibit mammary cancer cell growth." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 301(3): E504-510.
- Hunt, L. C. and J. White (2016). "The Role of Leukemia Inhibitory Factor Receptor Signaling in Skeletal Muscle Growth, Injury and Disease." *Adv Exp Med Biol* 900: 45-59.
- Hutt, J. A. and J. W. DeWille (2002). "Oncostatin M induces growth arrest of mammary epithelium via a CCAAT/enhancer-binding protein delta-dependent pathway." *Mol Cancer Ther* 1(8): 601-610.
- Incognito, A. V., J. F. Burr, et al. (2016). "The Effects of Ischemic Preconditioning on Human Exercise Performance." *Sports Med* 46(4): 531-544.
- Jackson, H. W., V. Defamie, et al. (2017). "TIMPs: versatile extracellular regulators in cancer." *Nat Rev Cancer* 17(1): 38-53.
- Jankord, R. and B. Jemiolo (2004). "Influence of physical activity on serum IL-6 and IL-10 levels in healthy older men." *Med Sci Sports Exerc* 36(6): 960-964.
- Jean-St-Michel, E., C. Manhiot, et al. (2011). "Remote preconditioning improves maximal performance in highly trained athletes." *Med Sci Sports Exerc* 43(7): 1280-1286.
- Jeansson, M., A. Gawlik, et al. (2011). "Angiopoietin-1 is essential in mouse vasculature during development and in response to injury." *J Clin Invest* 121(6): 2278-2289.
- Jeffries, O., M. Waldron, et al. (2018). "Enhanced Local Skeletal Muscle Oxidative Capacity and Microvascular Blood Flow Following 7-Day Ischemic Preconditioning in Healthy Humans." *Front Physiol* 9: 463.
- Jia, D., M. Cai, et al. (2018). "Interval exercise training increases LIF expression and prevents myocardial infarction-induced skeletal muscle atrophy in rats." *Life Sci* 193: 77-86.
- Kadoglou, N. P., I. S. Vrabas, et al. (2010). "Exercise ameliorates serum MMP-9 and TIMP-2 levels in patients with type 2 diabetes." *Diabetes Metab* 36(2): 144-151.
- Keir, D. A., F. Theriault, et al. (2013). "Evaluation of the running-based anaerobic sprint test as a measure of repeated sprint ability in collegiate-level soccer players." *J Strength Cond Res* 27(6): 1671-1678.
- Kido, K., T. Suga, et al. (2015). "Ischemic preconditioning accelerates muscle deoxygenation dynamics and enhances exercise endurance during the work-to-work test." *Physiol Rep* 3(5).
- Kimura, M., K. Ueda, et al. (2007). "Repetition of ischemic preconditioning augments endothelium-dependent vasodilation in humans: role of endothelium-derived nitric oxide and endothelial progenitor cells." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27(6): 1403-1410.
- Kochanowicz, A., S. Sawczyn, et al. (2017). "Cellular Stress Response Gene Expression During Upper and Lower Body High Intensity Exercises." *PLoS One* 12(1): e0171247.
- Komulainen, P., M. Pedersen, et al. (2008). "BDNF is a novel marker of cognitive function in ageing women: the DR's EXTRA Study." *Neurobiol Learn Mem* 90(4): 596-603.
- Konstantinov, I. E., J. Li, et al. (2005). "Remote ischemic preconditioning of the recipient reduces myocardial ischemia-reperfusion injury of the denervated donor heart via a Katp channel-dependent mechanism." *Transplantation* 79(12): 1691-1695.
- Koskinen, S. O., M. Hoyhtya, et al. (2001). "Serum concentrations of collagen degrading enzymes and their inhibitors after downhill running." *Scand J Med Sci Sports* 11(1): 9-15.

- Koskinen, S. O., W. Wang, et al. (2001). "Acute exercise induced changes in rat skeletal muscle mRNAs and proteins regulating type IV collagen content." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280(5): R1292-1300.
- Koti, R. S., A. M. Seifalian, et al. (2002). "The relationship of hepatic tissue oxygenation with nitric oxide metabolism in ischemic preconditioning of the liver." *FASEB J* 16(12): 1654-1656.
- Kowianski, P., G. Lietzau, et al. (2018). "BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity." *Cell Mol Neurobiol* 38(3): 579-593.
- Kuhn, R., J. Lohler, et al. (1993). "Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis." *Cell* 75(2): 263-274.
- Kurek, J. B., J. J. Bower, et al. (1997). "The role of leukemia inhibitory factor in skeletal muscle regeneration." *Muscle Nerve* 20(7): 815-822.
- Kwon, J. H., K. M. Moon, et al. (2020). "Exercise-Induced Myokines can Explain the Importance of Physical Activity in the Elderly: An Overview." *Healthcare (Basel)* 8(4).
- Lalonde, F. and D. Y. Curnier (2015). "Can anaerobic performance be improved by remote ischemic preconditioning?" *J Strength Cond Res* 29(1): 80-85.
- Lambert, E., E. Dasse, et al. (2004). "TIMPs as multifacial proteins." *Crit Rev Oncol Hematol* 49(3): 187-198.
- Laske, C., E. Stransky, et al. (2006). "Stage-dependent BDNF serum concentrations in Alzheimer's disease." *J Neural Transm (Vienna)* 113(9): 1217-1224.
- Laurentino, G., C. Ugrinowitsch, et al. (2008). "Effects of strength training and vascular occlusion." *Int J Sports Med* 29(8): 664-667.
- Lawson, C. S. and J. M. Downey (1993). "Preconditioning: state of the art myocardial protection." *Cardiovasc Res* 27(4): 542-550.
- Le, J. M., D. Weinstein, et al. (1987). "Induction of membrane-associated interleukin 1 by tumor necrosis factor in human fibroblasts." *J Immunol* 138(7): 2137-2142.
- Levine, T. and C. Hullett (2002). "Eta Squared, Partial Eta Squared, and Misreporting of Effect Size in Communication Research." *Human Communication Research* 28 4: 612 - 625.
- Li, L., X. Li, et al. (2013). "Expression, characterization, and preliminary X-ray crystallographic analysis of recombinant murine Follistatin-like 1 expressed in *Drosophila* S2 cells." *Biosci Trends* 7(2): 93-100.
- Li, W., M. Alahdal, et al. (2020). "Molecular functions of FSTL1 in the osteoarthritis." *Int Immunopharmacol* 83: 106465.
- Li, Y. and J. Huard (2002). "Differentiation of muscle-derived cells into myofibroblasts in injured skeletal muscle." *Am J Pathol* 161(3): 895-907.
- Liau, S. K., B. B. Rubin, et al. (1996). "Sequential ischemia/reperfusion results in contralateral skeletal muscle salvage." *Am J Physiol* 270(4 Pt 2): H1407-1413.
- Liu, J., H. Yu, et al. (2015). "LIF is a new p53 negative regulator." *J Nat Sci* 1(7): e131.
- Lo Presti, R., E. Hopps, et al. (2017). "Gelatinases and physical exercise: A systematic review of evidence from human studies." *Medicine (Baltimore)* 96(37): e8072.
- Mackey, A. L., A. E. Donnelly, et al. (2004). "Skeletal muscle collagen content in humans after high-force eccentric contractions." *J Appl Physiol* 97(1): 197-203.
- Madden, M. C., W. C. Byrnes, et al. (2011). "Plasma matrix metalloproteinase-9 response to eccentric exercise of the elbow flexors." *Eur J Appl Physiol* 111(8): 1795-1805.
- Malik, N., J. C. Kallestad, et al. (1989). "Molecular cloning, sequence analysis, and functional expression of a novel growth regulator, oncostatin M." *Mol Cell Biol* 9(7): 2847-2853.
- Mallick, I. H., W. Yang, et al. (2005). "Ischaemic preconditioning improves microvascular perfusion and oxygenation following reperfusion injury of the intestine." *Br J Surg* 92(9): 1169-1176.
- Marocolo, M., G. R. da Mota, et al. (2015). "Are the Beneficial Effects of Ischemic Preconditioning on Performance Partly a Placebo Effect?" *Int J Sports Med* 36(10): 822-825.
- Marocolo, M., I. C. Marocolo, et al. (2016). "Beneficial Effects of Ischemic Preconditioning in Resistance Exercise Fade Over Time." *Int J Sports Med* 37(10): 819-824.

- Marocolo, M., J. M. Willardson, et al. (2016). "Ischemic Preconditioning and Placebo Intervention Improves Resistance Exercise Performance." *J Strength Cond Res* 30(5): 1462-1469.
- Matthews, D. R., J. P. Hosker, et al. (1985). "Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man." *Diabetologia* 28(7): 412-419.
- Matthews, V. B., M. B. Astrom, et al. (2009). "Brain-derived neurotrophic factor is produced by skeletal muscle cells in response to contraction and enhances fat oxidation via activation of AMP-activated protein kinase." *Diabetologia* 52(7): 1409-1418.
- McLester, C. N., B. S. Nickerson, et al. (2020). "Reliability and Agreement of Various InBody Body Composition Analyzers as Compared to Dual-Energy X-Ray Absorptiometry in Healthy Men and Women." *J Clin Densitom* 23(3): 443-450.
- Metcalf, D. (2003). "The unsolved enigmas of leukemia inhibitory factor." *Stem Cells* 21(1): 5-14.
- Mieszkowski, J., M. Kochanowicz, et al. (2019). "Ferritin Genes Overexpression in PBMC and a Rise in Exercise Performance as an Adaptive Response to Ischaemic Preconditioning in Young Men." *Biomed Res Int* 2019: 9576876.
- Mieszkowski, J., B. Stankiewicz, et al. (2020). "Effect of Ischemic Preconditioning on Marathon-Induced Changes in Serum Exerkine Levels and Inflammation." *Front Physiol* 11: 571220.
- Mieszkowski, J., B. E. Stankiewicz, et al. (2021). "Remote Ischemic Preconditioning Reduces Marathon-Induced Oxidative Stress and Decreases Liver and Heart Injury Markers in the Serum." *Front Physiol* 12: 731889.
- Miller, M., A. Beppu, et al. (2015). "Fstl1 Promotes Asthmatic Airway Remodeling by Inducing Oncostatin M." *J Immunol* 195(8): 3546-3556.
- Molanouri Shamsi, M., S. Chekachak, et al. (2019). "Effects of exercise training and supplementation with selenium nanoparticle on T-helper 1 and 2 and cytokine levels in tumor tissue of mice bearing the 4 T1 mammary carcinoma." *Nutrition* 57: 141-147.
- Moore, K. W., R. de Waal Malefyt, et al. (2001). "Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor." *Annu Rev Immunol* 19: 683-765.
- Mudaliar, H., B. Rayner, et al. (2017). "Remote ischemic preconditioning attenuates EGR-1 expression following myocardial ischemia reperfusion injury through activation of the JAK-STAT pathway." *Int J Cardiol* 228: 729-741.
- Murakami, K., M. Tanaka, et al. (2012). "Follistatin-related protein/follistatin-like 1 evokes an innate immune response via CD14 and toll-like receptor 4." *FEBS Lett* 586(4): 319-324.
- Murry, C. E., R. B. Jennings, et al. (1986). "Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium." *Circulation* 74(5): 1124-1136.
- Neubauer, O., S. Sabapathy, et al. (2014). "Time course-dependent changes in the transcriptome of human skeletal muscle during recovery from endurance exercise: from inflammation to adaptive remodeling." *J Appl Physiol* (1985) 116(3): 274-287.
- Nicola, N. A. and J. J. Babon (2015). "Leukemia inhibitory factor (LIF)." *Cytokine Growth Factor Rev* 26(5): 533-544.
- Nielsen, A. R., P. Hojman, et al. (2008). "Association between interleukin-15 and obesity: interleukin-15 as a potential regulator of fat mass." *J Clin Endocrinol Metab* 93(11): 4486-4493.
- Nielsen, A. R., R. Mounier, et al. (2007). "Expression of interleukin-15 in human skeletal muscle effect of exercise and muscle fibre type composition." *J Physiol* 584(Pt 1): 305-312.
- Nielsen, A. R. and B. K. Pedersen (2007). "The biological roles of exercise-induced cytokines: IL-6, IL-8, and IL-15." *Appl Physiol Nutr Metab* 32(5): 833-839.
- Niespodzinski, B., J. Mieszkowski, et al. (2021). "Effect of 10 consecutive days of remote ischemic preconditioning on local neuromuscular performance." *J Electromyogr Kinesiol* 60: 102584.
- Nordan, R. P., J. G. Pumphrey, et al. (1987). "Purification and NH2-terminal sequence of a plasmacytoma growth factor derived from the murine macrophage cell line P388D1." *J Immunol* 139(3): 813-817.
- Ogura, Y., N. Ouchi, et al. (2012). "Therapeutic impact of follistatin-like 1 on myocardial ischemic injury in preclinical models." *Circulation* 126(14): 1728-1738.

- Ostrowski, K., C. Hermann, et al. (1998). "A trauma-like elevation of plasma cytokines in humans in response to treadmill running." *J Physiol* 513 (Pt 3): 889-894.
- Paixao, R. C., G. R. da Mota, et al. (2014). "Acute Effect of Ischemic Preconditioning is Detrimental to Anaerobic Performance in Cyclists." *Int J Sports Med* 35(11): e5.
- Pang, C. Y., P. Neligan, et al. (1997). "Role of ATP-sensitive K⁺ channels in ischemic preconditioning of skeletal muscle against infarction." *Am J Physiol* 273(1 Pt 2): H44-51.
- Pang, C. Y., R. Z. Yang, et al. (1995). "Acute ischaemic preconditioning protects against skeletal muscle infarction in the pig." *Cardiovasc Res* 29(6): 782-788.
- Paradis-Deschenes, P., D. R. Joanisse, et al. (2016). "Ischemic preconditioning increases muscle perfusion, oxygen uptake, and force in strength-trained athletes." *Appl Physiol Nutr Metab* 41(9): 938-944.
- Paradis-Deschenes, P., D. R. Joanisse, et al. (2018). "Ischemic Preconditioning Improves Time Trial Performance at Moderate Altitude." *Med Sci Sports Exerc* 50(3): 533-541.
- Patterson, S. D., N. E. Bezodis, et al. (2015). "The Effect of Ischemic Preconditioning on Repeated Sprint Cycling Performance." *Med Sci Sports Exerc* 47(8): 1652-1658.
- Peake, J. M., P. Della Gatta, et al. (2015). "Cytokine expression and secretion by skeletal muscle cells: regulatory mechanisms and exercise effects." *Exerc Immunol Rev* 21: 8-25.
- Pedersen, B. K. (2011). "Muscles and their myokines." *J Exp Biol* 214(Pt 2): 337-346.
- Pedersen, B. K. and M. A. Febbraio (2008). "Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6." *Physiol Rev* 88(4): 1379-1406.
- Pedersen, B. K. and M. A. Febbraio (2012). "Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ." *Nat Rev Endocrinol* 8(8): 457-465.
- Pedersen, B. K., A. Steensberg, et al. (2001). "Muscle-derived interleukin-6: possible biological effects." *J Physiol* 536(Pt 2): 329-337.
- Pistilli, E. E., P. M. Siu, et al. (2007). "Interleukin-15 responses to aging and unloading-induced skeletal muscle atrophy." *Am J Physiol Cell Physiol* 292(4): C1298-1304.
- Przyklenk, K., B. Bauer, et al. (1993). "Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion." *Circulation* 87(3): 893-899.
- Pue, C. A., R. F. Mortensen, et al. (1996). "Acute phase levels of C-reactive protein enhance IL-1 beta and IL-1ra production by human blood monocytes but inhibit IL-1 beta and IL-1ra production by alveolar macrophages." *J Immunol* 156(4): 1594-1600.
- Pyatibratov, M. G. and A. S. Kostyukova (2012). "New insights into the role of angiogenin in actin polymerization." *Int Rev Cell Mol Biol* 295: 175-198.
- Quinn, L. S., B. G. Anderson, et al. (2009). "Oversecretion of interleukin-15 from skeletal muscle reduces adiposity." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296(1): E191-202.
- Ries, C. (2014). "Cytokine functions of TIMP-1." *Cell Mol Life Sci* 71(4): 659-672.
- Rose-John, S. (2018). "Interleukin-6 Family Cytokines." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 10(2).
- Salvador, A. F., R. A. De Aguiar, et al. (2016). "Ischemic Preconditioning and Exercise Performance: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Int J Sports Physiol Perform* 11(1): 4-14.
- Sanchis-Gomar, F., C. Bonaguri, et al. (2013). "Effects of acute exercise and xanthine oxidase inhibition on novel cardiovascular biomarkers." *Transl Res* 162(2): 102-109.
- Schroeder, C. A., Jr., H. T. Lee, et al. (1996). "Preconditioning with ischemia or adenosine protects skeletal muscle from ischemic tissue reperfusion injury." *J Surg Res* 63(1): 29-34.
- Sheng, J. and Z. Xu (2016). "Three decades of research on angiogenin: a review and perspective." *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 48(5): 399-410.
- Shimizu, M., I. E. Konstantinov, et al. (2007). "Effects of intermittent lower limb ischaemia on coronary blood flow and coronary resistance in pigs." *Acta Physiol (Oxf)* 190(2): 103-109.
- Smith, D. A., S. D. Irving, et al. (2001). "Serum levels of the antiinflammatory cytokine interleukin-10 are decreased in patients with unstable angina." *Circulation* 104(7): 746-749.
- Smith, J. K., R. Dykes, et al. (1999). "Long-term exercise and atherogenic activity of blood mononuclear cells in persons at risk of developing ischemic heart disease." *JAMA* 281(18): 1722-1727.

- Snell, E. S. and E. Atkins (1965). "The Presence of Endogenous Pyrogen in Normal Rabbit Tissues." *J Exp Med* 121: 1019-1038.
- Song, M. and J. A. Kellum (2005). "Interleukin-6." *Crit Care Med* 33(12 Suppl): S463-465.
- Steensberg, A., C. P. Fischer, et al. (2003). "IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285(2): E433-437.
- Stetler-Stevenson, W. G. (2008). "Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities." *Sci Signal* 1(27): re6.
- Stranska, Z. and S. Svacina (2015). "[Myokines - muscle tissue hormones]." *Vnitř Lek* 61(4): 365-368.
- Strle, K., J. H. Zhou, et al. (2001). "Interleukin-10 in the brain." *Crit Rev Immunol* 21(5): 427-449.
- Takai, Y., G. G. Wong, et al. (1988). "B cell stimulatory factor-2 is involved in the differentiation of cytotoxic T lymphocytes." *J Immunol* 140(2): 508-512.
- Takarada, Y., Y. Sato, et al. (2002). "Effects of resistance exercise combined with vascular occlusion on muscle function in athletes." *Eur J Appl Physiol* 86(4): 308-314.
- Tchou, I., A. Margeli, et al. (2009). "Growth-differentiation factor-15, endoglin and N-terminal pro-brain natriuretic peptide induction in athletes participating in an ultramarathon foot race." *Biomarkers* 14(6): 418-422.
- Tello-Montoliu, A., J. V. Patel, et al. (2006). "Angiogenin: a review of the pathophysiology and potential clinical applications." *J Thromb Haemost* 4(9): 1864-1874.
- Thom, G., M. Kavaliuskas, et al. (2020). "Changes in lactate kinetics underpin soccer performance adaptations to cycling-based sprint interval training." *Eur J Sport Sci* 20(4): 486-494.
- Tiku, K., M. L. Tikku, et al. (1986). "Interleukin 1 production by human polymorphonuclear neutrophils." *J Immunol* 136(10): 3677-3685.
- Tilg, H., C. A. Dinarello, et al. (1997). "IL-6 and APPs: anti-inflammatory and immunosuppressive mediators." *Immunol Today* 18(9): 428-432.
- Valenzuela, P. L., R. Martin-Candilejo, et al. (2021). "Ischemic Preconditioning and Muscle Force Capabilities." *J Strength Cond Res* 35(8): 2187-2192.
- Van Snick, J., S. Cayphas, et al. (1986). "Purification and NH₂-terminal amino acid sequence of a T-cell-derived lymphokine with growth factor activity for B-cell hybridomas." *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(24): 9679-9683.
- Verstappen, J. and J. W. Von den Hoff (2006). "Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): their biological functions and involvement in oral disease." *J Dent Res* 85(12): 1074-1084.
- Wahl, A. F. and P. M. Wallace (2001). "Oncostatin M in the anti-inflammatory response." *Ann Rheum Dis* 60 Suppl 3: iii75-80.
- Wallace, P. M., J. F. MacMaster, et al. (1999). "Regulation of inflammatory responses by oncostatin M." *J Immunol* 162(9): 5547-5555.
- Wei, M., P. Xin, et al. (2011). "Repeated remote ischemic preconditioning protects against adverse left ventricular remodeling and improves survival in a rat model of myocardial infarction." *Circ Res* 108(10): 1220-1225.
- Weigert, C., M. Hoene, et al. (2019). "Hepatokines-a novel group of exercise factors." *Pflugers Arch* 471(3): 383-396.
- Weissenbach, J., Y. Chernajovsky, et al. (1980). "Two interferon mRNAs in human fibroblasts: in vitro translation and Escherichia coli cloning studies." *Proc Natl Acad Sci U S A* 77(12): 7152-7156.
- Wischhusen, J., I. Melero, et al. (2020). "Growth/Differentiation Factor-15 (GDF-15): From Biomarker to Novel Targetable Immune Checkpoint." *Front Immunol* 11: 951.
- Wisse, B. E. and M. W. Schwartz (2003). "The skinny on neurotrophins." *Nat Neurosci* 6(7): 655-656.
- Woolley, D. E., D. R. Roberts, et al. (1975). "Inhibition of human collagenase activity by a small molecular weight serum protein." *Biochem Biophys Res Commun* 66(2): 747-754.
- Xu, X., T. Zhang, et al. (2020). "Follistatin-like 1 as a Novel Adipomyokine Related to Insulin Resistance and Physical Activity." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 105(12): e4499-e4509.
- Yamashita, N., S. Hoshida, et al. (1998). "A "second window of protection" occurs 24 h after ischemic preconditioning in the rat heart." *J Mol Cell Cardiol* 30(6): 1181-1189.

Zhou, W., D. Zeng, et al. (2010). "Limb ischemic preconditioning reduces heart and lung injury after an open heart operation in infants." *Pediatr Cardiol* 31(1): 22-29.

Spis tabel i rycin

Tabele

Tabela 1. Wyniki analizy budowy i składu ciała przed jednorazową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej

Tabela 2. Wartości średnie i odchylenia standardowe wyników budowy oraz składu ciała przed i po 10 dniowej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej

Tabela 3. Jednoczynnikowa analiza wariancji wyników 30s Wingate testu po jednorazowej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej

Tabela 4. Dwuczynnikowa analiza wariancji z powtarzanym pomiarem (2 grupy x 2 punkty czasowe) wyników 30s Wingate testu przed i po 10 dniowej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej

Tabela 5. Dwuczynnikowa analiza wariancji z powtarzanym pomiarem (2 grupy x 3 punkty czasowe) stężenia kwasu mlekowego i glukozy we krwi po jednorazowej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej indukowanego 30s Wingate testem

Tabela 6. Dwuczynnikowa analiza wariancji z powtarzanym pomiarem (2 grupy x 3 punkty czasowe) stężenia kwasu mlekowego i glukozy we krwi indukowanego 30s Wingate testem przed 10 dniową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej

Tabela 7. Dwuczynnikowa analiza wariancji z powtarzanym pomiarem (2 grupy x 3 punkty poboru) wyników stężenia kwasu mlekowego i glukozy we krwi po 10 dniowej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej indukowanej 30s testem Wingate

Tabela 8. Dwuczynnikowa analiza wariancji z powtarzanym pomiarem (2 grupy x 4 punkty czasowe) stężenia wyjściowego markerów stanu zapalnego po jednorazowej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej

Tabela 9. Dwuczynnikowa analiza wariancji z powtarzanym pomiarem (2 grupy x 3 punkty czasowe) stężenia markerów stanu zapalnego we krwi po jednorazowej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej indukowanej 30s Wingate testem

Tabela 10. Dwuczynnikowa analiza wariancji z powtarzanym pomiarem (2 grupy x 3 punkty czasowe) stężenia markerów stanu zapalnego we krwi indukowanych 30s Wingate testem przed 10 dniową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej

Tabela 11. Dwuczynnikowa analiza wariancji z powtarzanym pomiarem (2 grupy x 2 punkty czasowe) stężenia wyjściowego markerów stanu zapalnego we krwi indukowanych 10 dniową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej

Tabela 12. Dwuczynnikowa analiza wariancji z powtarzanym pomiarem (2 grupy x 3 punkty czasowe) markerów stanu zapalnego we krwi po 10 dniowej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej indukowanej 30s Wingate testem

Ryciny

Rycina 1. Schemat procedury drugiego etapu badań

Rycina 2. Schemat procedury trzeciego etapu badań

Rycina 3. Zdjęcia USG Doppler (Edan Instruments GmbH, SonoTrax Basic, Germany) przepływu krwi w odcinku tętnicy podkolanowej podczas protokołu zdalnego hartowania przez niedokrwienie z doraźnym uciskiem mankietu sfigmomanometru kończy dolnej niedominującej na poziomie 220 mmHg (A) i udawanym uciskiem mankietu sfigmomanometru kończyny dolnej niedominującej na poziomie 20 mmHg (B).

Rycina 4. Wyniki 30s Wingate test po jednorazowej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej (wartości średnie i odchylenia standardowe).

Rycina 5. Wyniki jednorazowego 30s Wingate testu przed i po 10 dniowym zdalnym hartowaniu przez niedokrwienie kończyny dolnej (wartości średnie i odchylenia standardowe).

Rycina 6. Stężenie kwasu mlekowego i glukozy we krwi po jednorazowej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej indukowanej 30s Wingate testem (wartości średnie i odchylenia standardowe).

Rycina 7. Stężenie kwasu mlekowego oraz glukozy we krwi indukowanego 30s Wingate testem przed 10 dniową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej (wartości średnie i odchylenia standardowe).

Rycina 8. Stężenie kwasu mlekowego i glukozy po 10 dniowej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej indukowanej 30s Wingate testem (wartości średnie i odchylenia standardowe).

Rycina 9a. Stężenie wyjściowe markerów stanu zapalnego we krwi po jednorazowej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej (wartości średnie i odchylenie standardowe)

Rycina 9b. Stężenie wyjściowe markerów stanu zapalnego we krwi po jednorazowej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej (wartości średnie i odchylenie standardowe)

Rycina 10a. Stężenie markerów stanu zapalnego we krwi po jednorazowej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej indukowanej 30s Wingate testem (wartości średnie i odchylenie standardowe)

Rycina 10b. Stężenie markerów stanu zapalnego we krwi po jednorazowej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej indukowanej 30s Wingate testem (wartości średnie i odchylenie standardowe)

Rycina 11a. Stężenie markerów stanu zapalnego we krwi indukowanych 30s Wingate testem przed 10 dniową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej (wartości średnie i odchylenie standardowe).

Rycina 11b. Stężenie markerów stanu zapalnego we krwi indukowanych 30s Wingate testem przed 10 dniową procedurą zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej (wartości średnie i odchylenie standardowe).

Rycina 12a. Stężenie wyjściowe markerów stanu zapalnego we krwi przed i po 10 dniowej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej (wartości średnie i odchylenie standardowe)

Rycina 12b. Stężenie wyjściowe markerów stanu zapalnego we krwi przed i po 10 dniowej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej (wartości średnie i odchylenie standardowe)

Rycina 13a. Stężenie markerów stanu zapalnego we krwi po 10 dniowej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej indukowanej 30s Wingate testem (wartości średnie i odchylenie standardowe).

Rycina 13b. Stężenie markerów stanu zapalnego we krwi po 10 dniowej procedurze zdalnego hartowania przez niedokrwienie kończyny dolnej indukowanej 30s Wingate testem (wartości średnie i odchylenie standardowe).

Aneks

Załącznik 1. Zgoda komisji bioetycznej na przeprowadzenie badania



KOMISJA BIOETYCZNA
przy Okręgowej Izbie Lekarskiej

80-204 Gdańsk
ul. Sniadeckich 33
www.komisjabioetyczna.pl

tel. 58 524 32 50
fax 58 524 32 51
e-mail: biotetyka@komisjabioetyczna.pl

KB – 24 / 16

Gdańsk, dnia 14 grudnia 2016 r.

Główny Badacz: prof. dr hab. Jędrzej Antosiewicz

Miejsce prowadzenia badania: Akademia Wychowania Fizycznego i Sportu w Gdańsku, ul. Kazimierza Górskiego 1, 80-336 Gdańsk

Tytuł pracy naukowej: „Wpływ hartowania przez niedokrwienie kończyn górnych i dolnych na poziom możliwości wysiłkowych młodych mężczyzn.”

Komisja Bioetyczna przy Okręgowej Izbie Lekarskiej w Gdańsku przyjęła do akceptującej wiadomości informacje o w/w pracy naukowej i nie zgłasza zastrzeżeń co do jej przeprowadzenia.

PRZEWODNICZĄCY
KOMISJI BIOETYCZNEJ
przy Okręgowej Izbie Lekarskiej w Gdańsku

Dr hab. n. med. Wojciech Makarewicz