

**AKADEMIA WYCHOWANIA FIZYCZNEGO I SPORTU IM.
JĘDRZEJA ŚNIADECKIEGO W GDAŃSKU**

mgr Maja Tomczyk

Rozprawa doktorska

**Zmiany w metabolizmie żelaza indukowane
wysiłkiem fizycznym oraz dietą**



Promotor:

prof. dr hab. Jędrzej Antosiewicz

Gdańsk 2020

**JĘDRZEJ ŚNIADECKI ACADEMY OF PHYSICAL
EDUCATION AND SPORT IN GDAŃSK**

Maja Tomczyk MSc

Doctoral dissertation

**Changes in iron metabolism induced by
physical effort and diet**



Supervisor:

prof. dr hab. Jędrzej Antosiewicz

Gdańsk 2020

SPIS TREŚCI

1. Wykaz używanych skrótów.....	4
2. Autoreferat w języku polskim.....	5
2.1. Wstęp	
2.2. Cel badań	
2.3. Metody badawcze i omówienie wyników	
2.3.1. Metody badawcze zastosowane w pracy „Simple sugar supplementation abrogates-exercise-induced increase in hepcidin in young men”	
2.3.2. Omówienie wyników pracy „Simple sugar supplementation abrogates exercise-induced increase in hepcidin in young men”	
2.3.3. Metody badawcze zastosowane w pracy „Marathon run-induced changes in the erythropoietin- erythroferrone-hepcidin axis are iron dependent”	
2.3.4. Omówienie wyników pracy „Marathon run-induced changes in the erythropoietin-erythroferrone-hepcidin axis are iron dependent”	
2.3.5. Metody badawcze zastosowane w pracy „Suplementacja związkami antyoksydacyjnymi w sporcie: Przegląd piśmiennictwa”	
2.3.6. Omówienie wyników pracy „Suplementacja związkami antyoksydacyjnymi w sporcie: Przegląd piśmiennictwa”	
2.4. Wnioski	
3. Dissertation summary in English.....	20
3.1. Introduction	
3.2. Research objective	
3.3. Methods, results and discussion	
3.3.1. Methods used in the study “Simple sugar supplementation abrogates exercise-induced increase in hepcidin in young men”	

3.3.2.	Results and discussion about the study report “Simple sugar supplementation abrogates exercise-induced increase in hepcidin in young men”	
3.3.3.	Methods used in the study “Marathon run-induced changes in the erythropoietin-erythroferrone-hepcidin axis are iron-dependent”	
3.3.4.	Results and discussion about the study report “Marathon run-induced changes in the erythropoietin-erythroferrone-hepcidin axis are iron-dependent”	
3.3.5.	Research procedures used in the study “Supplementation with antioxidants in sports: Literature review.”	
3.3.6.	Results and discussion about the study „Supplementation with antioxidants in sports: Literature review.”	
3.4.	Conclusions	
4.	Piśmiennictwo / References.....	33
5.	Załączniki.....	35
▪	Oświadczenia współautorów	
▪	Publikacja nr 1 pt.: „Suplementacja związkami antyoksydacyjnymi w sporcie. Przegląd piśmiennictwa”	
▪	Publikacja nr 2 pt.: „Simple sugar supplementation abrogates exercise-induced increase in hepcidin in young men”	
▪	Publikacja nr 3 pt.: „Marathon Run-induced Changes in the Erythropoietin-Erythroferrone-Hepcidin Axis are Iron Dependent “	

1. Wykaz używanych skrótów

ATP – (ang. Adenosine triphosphate) – Adenozynotrójfosforan

DNA – (ang. Deoxyribonucleic acid) – Kwas deoksyrybonukleinowy

EPO – (ang. Erythropoietin) – Erytropoetyna

EPOR – (ang. Receptor for Erythropoietin) – Kompleks receptora erytropoetyny

ERFE – (ang. Erythroferrone) – Erytroferron

HFE – (ang. Human homeostatic iron regulator protein) – Ludzkie homeostatyczne białko regulujące żelazo

HMGB-1 – (ang. High mobility group box 1 protein) – Białko o dużej ruchliwości elektroforetycznej

HpC – (ang. Hepcidin) – Hepcydyna

HsCrP – (ang. High-Sensitivity CRP) – Białko C-reaktywne oznaczane ultraczułą metodą

IL-6 – (ang. Interleukin 6) – Interleukina 6

RNA – (ang. Ribonucleic acid) – Kwas rybonukleinowy

TFR2 – (ang. Transferrin receptor 2) – Receptor transferyny 2

WHO – (ang. World Health Organization) – Światowa Organizacja Zdrowia

2. Autoreferat w języku polskim

Niniejszą rozprawę doktorską oparto o cykl trzech publikacji pod wspólnym tytułem: „Zmiany w metabolizmie żelaza indukowane wysiłkiem fizycznym oraz dietą”, na który składają się:

- *Suplementacja związkami antyoksydacyjnymi w sporcie: Przegląd piśmiennictwa*. Medycyna Sportowa, 2015, vol. 31, 1, 1-9, doi: 10.5604/1232406X.1150313, punktacja MNiSW – 14 pkt.
- *Simple sugar supplementation abrogates exercise-induced increase in hepcidin in young men*. Journal of the International Society of Sports Nutrition, 2017, vol. 14, 10, 1-5, doi: 10.1186/s12970-017-0169-8, impact factor – 3,135, punktacja MNiSW – 25 pkt.
- *Marathon run-induced changes in the erythropoietin-erythroferrone-hepcidin axis are iron dependent*. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2020, vol. 17, 8, 2781, 1-9, doi: 10.3390/ijerph17082781, impact factor – 2,468, punktacja MNiSW – 70 pkt.

2.1. Wstęp

Od czasów starożytnych dostrzegano istotną rolę żelaza dla zdrowia człowieka. Jego lecznicze właściwości znali i z sukcesami stosowali już Egipcjanie, Hindusi, Grecy i Rzymianie (Woods, Eggleston and Krebs 1970; McDowell 2003). Również opisy z XVII wieku sugerują, że żelazo było wykorzystywane w leczeniu chlorozy, choroby objawiającej się zielonym zabarwieniem skóry, której przyczyna często upatrywana była w jego niedoborze w organizmie (Guggenheim 1995). Jednakże, dopiero w 1932 r., znaczenie żelaza ostatecznie ugruntowały odkrycia dowodzące, że żelazo jest potrzebne do syntezy hemoglobiny, która warunkuje proces oddychania komórkowego (Ziegler and Filer 1996).

Żelazo jest mikroelementem zaangażowanym w szereg procesów zapewniających homeostazę organizmu ludzkiego, wśród których, obok uczestnictwa w oddychaniu komórkowym, wymienić należy biosyntezę DNA i RNA, regulację ekspresji genów, czy proliferację i różnicowanie komórek (Lieu et al. 2001). W raporcie z 2017 roku 'Nutritional anaemias: Tools for effective prevention and control' Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) wskazuje, że niedobór żelaza, będący główną przyczyną niedokrwistości u wielu osób, może wpływać na zdrowie nawet dwóch miliardów ludzi, i niezależnie od negatywnych skutków niedokrwistości, wiąże się z opóźnionym rozwojem poznawczym i behawioralnym u dzieci, a także, ze zmniejszoną produktywnością u osób dorosłych i upośledzonym funkcjonowaniem poznawczym u kobiet (World Health Organization 2017). Z drugiej strony, zaburzeniem o równie istotnych implikacjach zdrowotnych, opisywanych w piśmiennictwie naukowym jest tzw. przeładowanie żelazem, które towarzyszy najczęstszemu zaburzeniu genetycznemu na świecie, jakim jest wrodzona hemochromatoza. W przebiegu hemochromatozy, nasilone wchłaniania żelaza w przewodzie pokarmowym, może prowadzić do tzw. „przeciążenia żelazem”, charakteryzującego się odkładaniem żelaza min. w wątrobie, trzustce i sercu. W konsekwencji przeciążenie może prowadzić do wielu zaburzeń zdrowotnych, w tym: cukrzycy, marskości wątroby, niewydolności serca czy nowotworzenia (Pietrangelo 2010; Brissot et al. 2018). Przyczynę uszkodzeń narządów upatruje się w powstawaniu nadmiernych ilości reaktywnych form tlenu, utworzonych głównie w wyniku reakcji Fentona, którą katalizują jony żelaza (Kohgo et al. 2008). Wielokierunkowe działanie żelaza w organizmie ludzkim oraz szereg negatywnych następstw zdrowotnych powstających na skutek zaburzenia jego gospodarki, odnajdują

odzwierciedlenie w złożonym, wewnątrzkomórkowym mechanizmie regulacji jego poziomu, który pozostaje nie w pełni poznany.

Wchłanianie żelaza zachodzi w enterocytach dwunastnicy, co poprzedzone jest redukcją żelaza niehemowego (Fe^{3+}) do jonu żelazawego (Fe^{2+}). W enterocytach żelazo może być przechowywane w postaci związanej przez ferrytynę lub przy udziale ferroportyny przedostawać się do krwioobiegu. Ferroportyna transportuje żelazo Fe^{2+} , które następnie ulega oksydacji do żelaza Fe^{3+} przy udziale białka hefajstyny lub ceruoplazminy i wbudowywane jest do głównego przENOŚNIKA żelaza, transferryny, wraz z którą, będzie dystrybuowane do określonych tkanek. Hormonem uznanawanym za główny czynnik regulujący absorpcję żelaza z diety i jego uwalnianie z makrofagów do krwioobiegu jest hepcydyna – 25-aminokwasowy peptyd syntetyzowany w wątrobie (Ganz 2003). Produkcja hepcydyny może odbywać się również w tkance tłuszczowej oraz tkankach takich organów jak, nerki, żołądek, , mózg, serce czy trzustka (Daher et al. 2019). Badania prowadzone na przestrzeni ostatnich lat wykazały, że synteza hepcydyny jest silnie stymulowana przez stan zapalny, towarzyszący intensywnemu wysiłkowi fizycznemu. Szczególne znaczenie w powyższym mechanizmie odgrywa cytokina prozapalna, jaką jest interleukina 6 (IL-6). Interleukina 6 pobudza syntezę hepcydyny, która ogranicza wchłanianie żelaza z jelita cienkiego i zmniejsza zdolność makrofagów do odzyskiwania żelaza ze starzejących się erytrocytów (Peeling et al. 2014). W analizie oceniającej powysiłkową fluktuację hepcydyny w moczu uczestniczek maratonu zaobserwowano wzrost jej stężenia u większości badanych kobiet (Roecker et al. 2005). Zmiany te odnajdują potwierdzenie w innych publikacjach, które podkreślają jednoczesną obecność stanu zapalnego u badanych sportowców (Antosiewicz et al. 2013; Ehn, Carlmark and Höglund 1980). Jednakże, dostępne są również doniesienia, w których nie stwierdzono różnic w stężeniach hepcydyny w odpowiedzi na wysiłek fizyczny (Kasprowicz et al. 2013). Fakt ten wskazuje na istnienie dodatkowych czynników warunkujących odmienną odpowiedź hormonalną. Do czynników mogących warunkować zróżnicowaną odpowiedź w powysiłkowych stężeniach hepcydyny zalicza się niedawno odkryty hormon erytoferrone (ERFE) oraz białko HMGB-1 (Kautz et al. 2014; Ranzato, Martinotti and Patrone 2015). Co istotne, ERFE hamuje biosyntezę hepcydyny, a jego działanie stymuluje erytropoetyna (EPO). W proponowanym mechanizmie działania ERFE, nasilona erytropoeza, towarzysząca min. regularnej aktywności fizycznej, powoduje różnicowanie się erytroblastów, czyli komórek prekursorowych krwinek czerwonych w szpiku kostnym i śledzionie, co wzmacnia produkcję i wydzielenie ERFE do krwioobiegu. ERFE działa bezpośrednio na wątrobę, hamując wytwarzanie hepcydyny, co z kolei zwiększa dostępność żelaza niezbędnego do syntezy

nowych czerwonych krwinek (Kautz et al. 2014). Ponadto zależność między metabolizmem żelaza, a osią EPO-ERFE-Hpc potwierdza działanie receptora transferynowego 2 (Tfr2), będącego składnikiem kompleksu receptora erytropoetyny (EPOR). Analizy na modelach zwierzęcych sugerują, że Tfr2 działa jako czujnik krążącego żelaza, który reguluje wrażliwość EPO, a w sytuacji przeładowania żelazem ogranicza jego działanie (Nai et al. 2015). Badania prowadzone *in vitro* wykazały także, że wątrobowy Tfr2 promując sygnalizację żelaza stymuluje syntezę hepcydyny i hamowanie przenikania żelaza do krwioobiegu (Nai et al. 2014).

Obok wzmożonej aktywności fizycznej czynnikiem mogącym modulować stan zapalny jest dieta (Galland 2010). Szczególne zainteresowanie naukowców budzi w ostatnich latach fruktoza, której średnie spożycie od początku XX wieku wzrosło czterokrotnie (Jameel 2014). Badania prowadzone zarówno *in vitro*, jak i na modelach zwierzęcych wykazały, że wysoka podaż fruktozy, poprzez nasilenie produkcji anionu ponadtlenkowego, indukuje stres oksydacyjny, który z kolei może powodować nasilenie wytwarzania mediatorów prozapalnych (Cirillo et al. 2009; Delbosc et al. 2005). Fakt ten odnajduje potwierdzenie w badaniach prowadzonych na ludziach, w których wysokie dawki fruktozy wpływają na wzrost stężenia białka C-reaktywnego (hs-CRP) (Jameel et al. 2014). Ponadto, ze względu na odmienny w stosunku do innych cukrów szlak metaboliczny, nadmierna konsumpcja fruktozy może przyczyniać się do negatywnych konsekwencji zdrowotnych. Brak ściśle kontrolowanych glikolitycznych punktów kontrolnych, może prowadzić do degradacji wątrobowych zapasów ATP i nukleotydów adeninowych, a w konsekwencji, do wzrostu stężenia kwasu moczowego w krwioobiegu skutkującego hiperurykemią, uznawaną za czynnik rozwoju otyłości, cukrzycy, chorób nerek oraz układu sercowo-naczyniowego (Woods, Eggleston and Krebs 1970; Soltani et al. 2013). Interesującym jest fakt, że w przebiegu powyższych zaburzeń obserwuje się również podwyższone stężenie ferrytyny we krwi (Knovich et al. 2009), co daje podstawy do przypuszczeń o powiązaniu wysokiej podaży fruktozy ze zmianami w metabolizmie żelaza. Badania prowadzone *in vitro* wykazały, że fruktoza i jej metabolity nasilają wchłanianie żelaza poprzez zdolność do tworzenia stabilnych kompleksów z żelazem, co potwierdzają obserwacje prowadzone na modelach zwierzęcych, w których absorpcja żelaza była stymulowana obecnością fruktozy, czego nie zaobserwowano w przypadku glukozy (Pabón de Roza, VanCampen and Miller 1986; Charley et al. 1963). Efekt wysokiej podaży fruktozy na zmiany w metabolizmie żelaza u ludzi, jak i powiązania pomiędzy dietą wysokofruktozową a wysiłkiem fizycznym pozostają jak dotąd nieznane.

Obok diety wysokofruktozowej, często poruszanym w ostatniej dekadzie zagadnieniem, szczególnie w środowiskach sportowych, jest suplementacja związkami antyoksydacyjnymi, która

jest wyraźne powiązania z metabolizmem żelaza. WzmóŜona produkcja reaktywnych form tlenu, towarzysząca intensywnemu wysiłkowi fizycznemu przyczynia się do uszkodzenia składników komórkowych, jak również, moŜe powodować osłabienie i zmęczenie mięśniowe (Allen, Lamb and Westerblad 2008; Powers and Jackson 2008). Co ciekawe, doniesienia ostatnich lat wskazują, Ŝe w warunkach stresu dochodzi do degradacji ferrytyny i uwolnienia Ŝelaza stymulującego produkcję reaktywnych form tlenu (Borkowska et al. 2011). Jak dotąd nie przedstawiono przekonywujących danych potwierdzających, Ŝe zaburzenia metabolizmu Ŝelaza odpowiadają za produkcję reaktywnych form tlenu w trakcie intensywnego wysiłku fizycznego, jednakŜe badania modelowe na liniach komórkowych sugerują taką moŜliwość (Halon-Golabek et al. 2018). Niezależnie od czynników etiologicznych reakcji wolnorodnikowych, odczuwalne efekty ich działania są jednym z powodów, dla których atleci sięgają po preparaty o charakterze przeciwutleniającym. Wysoki odsetek stosowania suplementów antyoksydacyjnych wśród polskich biegaczy średnio- i długodystansowych, ze znamioną częstotliwością suplementacji witaminy C zaobserwował w swoich badaniach Czaja J. Podobne spostrzeŜenia odnotowano w wyniku analiz prowadzonych z udziałem fińskich olimpijczyków, czy sportowców akademickich Uniwersytetu w Nebrasce. Obok najczęściej stosowanej witaminy C, wysoki odsetek suplementacji wśród atletów zaobserwowano w przypadku wit. A i E (Czaja 2010; Froiland et al. 2004; Heikkinen et al. 2011). Mimo popularności suplementów o charakterze antyoksydacyjnym, zasadność ich stosowania w aspekcie zapobiegania efektom wzmóŜonej produkcji reaktywnych form tlenu, jak również powiązanie z metabolizmem Ŝelaza wymagają dalszego zgłębienia.

Kolejnym czynnikiem mogącym wpływać na róŜnice w powysiłkowym metabolizmie Ŝelaza jest mutacja genu HFE, warunkująca rozwój wrodzonej hemochromatozy, będącej najczęstszym zaburzeniem genetycznym u przedstawicieli rasy kaukaskiej. Wrodzona hemochromatoza sklasyfikowana jest jako choroba wątroby, z pierwotną niewydolnością wytwarzania hepcydyny (Vujić 2014). Choroba objawia się obniŜonym poziomem ekspresji hepcydyny, co zwiększa aktywność ferroportyny i prowadzi do nasilonego wchłaniania Ŝelaza z pokarmów. Ŝelazo odkładając się w tkankach, moŜe prowadzić do uszkodzeń wielu narządów. Do trzech najczęściej występujących mutacji genu HFE, naleŜą: mutacja **H63D**, mutacja **S65C**, oraz mutacja **C282Y**, będąca najczęściej diagnozowanym polimorfizmem (European Association for the Study of the Liver 2010). Ze względu na brak danych, interesującym wydaje się być zagadnienie dotyczące oddziaływania intensywnego wysiłku fizycznego na metabolizm Ŝelaza u nosicieli mutacji w genie HFE.

Cel badań

Bazując na powyższych doniesieniach, w ramach prowadzonych badań postawiono następujące pytania badawcze:

- Czy wysoka podaż cukrów prostych wpływa na powysiłkowe zmiany w stężeniach Hpc oraz IL-6?
- Czy maraton wywoła zmiany w osi hormonalnej EPO, ERFE, Hpc?
- Czy wyjściowe stężenie żelaza i ferrytyny we krwi będą determinowały zmiany w stężeniach EPO, ERFE oraz Hpc indukowane przez bieg maratoński?
- Czy indukowane maratonom zmiany w metabolizmie żelaza, w przypadku nosicieli zmutowanego genu HFE, będą odmienne w stosunku do biegaczy, którzy nie posiadają tej mutacji?
- Czy suplementacja antyoksydantami w sporcie ma sens?

2.2. Metody badawcze i omówienie wyników

2.2.1. Metody badawcze zastosowane w pracy „Simple sugar supplementation abrogates -induced increase in hepcidin in young men”

Procedury badań

W randomizowanym, pojedynczo zaślepionym badaniu krzyżowym wzięło udział siedemnastu zdrowych mężczyzn, w wieku 20-25 lat, o średniej wartości $\text{VO}_2 \text{ max} = 51,06 \pm 8,9 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Badani zostali losowo podzieleni na grupę suplementującą napoje z fruktozą ($n=9$) oraz grupę suplementującą napoje z glukozą ($n=8$), w łącznej ilości 4 g cukru /kg m.c. Podczas 3-dniowego okresu suplementacji, wszyscy uczestnicy stosowali dietę o takiej samej zawartości makroskładników i łącznej kaloryczności 3541.90 kcal. Po tygodniowej przerwie, w trakcie której badani zachowywali swoją rutynową aktywność fizyczną, oraz nie zmieniali dotychczasowych nawyków żywieniowych, postępowanie wznowiono, z zastosowaniem zamiany grup. Przed rozpoczęciem badań, uczestnicy zostali poinformowani o celu i ryzyku badań, oraz udzielili pisemną zgodę na uczestnictwo w badaniach, zatwierdzoną przez Komisję Bioetyczną do Spraw Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym.

Laboratoryjna próba wysiłkowa

Przed rozpoczęciem oraz po zakończeniu 3-dniowego okresu suplementacyjnego wykonany został test o stopniowo zwiększającej się intensywności do odmowy kontynuowania wysiłku (test progresywny do odmowy). Próbę przeprowadzono w godzinach porannych, godzinę po spożyciu śniadania o takiej samej wartości odżywczej dla wszystkich uczestników. Test przeprowadzono na ergometrze rowerowym firmy Monark, z użyciem analizatora gazów MetaMAx3B, firmy Cortex. Przed rozpoczęciem właściwej próby, uczestnicy wykonali 5-minutową rozgrzewkę przy intensywności $1.5 \text{ W} \cdot \text{kg}^{-1}$, z kadencją pedałowania 60 obr / min. Bezpośrednio po rozgrzewce badani rozpoczęli test progresywny, w którym opór zwiększano o 25 W/min, aż do momentu, kiedy osiągnięto punkt wyczerpania wolicjonalnego. W trakcie testu mierzono oddechową wymianę gazową (Oxycon-Pro, Jaeger-Viasys Health Care, Hochberg, Niemcy). Analizatory O_2 i CO_2 zostały

skalibrowane przed każdym testem przy użyciu standardowych gazów o znanych stężeniach zgodnie z wytycznymi producenta.

Próbki krwi

Próbki krwi żyłnej pobrano z żyły łokciowej, do pojemników jednorazowego użytku z prokoagulantem. Pobranie krwi odbyło się dwukrotnie: w stanie spoczynku, bezpośrednio przed rozpoczęciem testu wysiłkowego oraz godzinę po jego zakończeniu. Bezpośrednio po pobraniu, próbki umieszczono w lodzie, a następnie wirowano przy 3000 g w 4°C, przez 10 min. Z pobranych próbek wyizolowano surowicę, która po przeniesieniu do probówek typu eppendorf została zamrożona w temperaturze -80°C do czasu oznaczeń.

Oznaczenia biochemiczne

Stężenia hepcydyny i IL-6 w surowicy określono przy użyciu komercyjnego zestawu ELISA (DRG Instruments, Marburg, Niemcy).

Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu oprogramowania Statistica 13.1. Wszystkie wartości wyrażono jako średnią $\pm$ odchylenie standardowe (SD). Do oceny jednorodności dyspersji z rozkładu normalnego zastosowano test Shapiro-Wilka. Do oceny jednorodności wariancji użyto testu Browna-Forsythe'go. W przypadku zmiennych jednorodnych przeprowadzono analizę wariancji (ANOVA) dla powtarzanych pomiarów oraz test post-hoc Tukeya na nierówne wielkości próbek, w celu zidentyfikowania znacząco różnych wyników. W przypadku próbki heterogenicznej zastosowano test ANOVA Friedmana i test post-hoc Dunna-Bonferroni'ego. Poziom istotności ustalono na $p < 0,05$.

2.2.2. Omówienie wyników pracy „Simple sugar supplementation abrogates exercise-induced increase in hepcidin in young men”

Uzyskane wyniki wskazują na istotny statystycznie powysiłkowy wzrost stężenia hepcydyny u badanych poddanych diecie standardowej, czego nie zaobserwowano w przypadku podaży wysokich dawek fruktozy lub glukozy. Jedną z hipotez tłumaczącą zahamowanie syntezy hepcydyny jest zjawisko tworzenia przez żelazo stabilnych kompleksów z fruktozą, zwiększających jego wchłanianie. Powyższy mechanizm potwierdzają badania *in vitro* oraz obserwacje prowadzone na modelach zwierzęcych, w których absorpcja żelaza była stymulowana przez fruktozę (Pabón de Rozo, VanCampen and Miller 1986), jednakże, odmiennie do uzyskanych przez nas wyników, takiego efektu nie zaobserwowano w przypadku glukozy. Jednocześnie, w żadnej z suplementowanych cukrami grup nie zaobserwowano zmian w spoczynkowych stężeniach hepcydyny. Ponadto, w przypadku osób suplementujących fruktozę, zaobserwowano istotny statystycznie powysiłkowy wzrost IL-6, co nie uwidoczniło się u osób otrzymujących glukozę. Obserwacja ta jest zgodna z doniesieniami, w których konsumpcja wysokiej ilości fruktozy przez ludzi, wpływała na wzrost stężenia białka C-reaktywnego (hs-CRP), co może świadczyć o nasilaniu stanu zapalnego oraz potencjalnie, o oddziaływaniu na metabolizm żelaza (Jameel et al. 2014). Jednakże, potwierdzenie tej hipotezy wymaga kolejnych badań, w szczególności, z zastosowaniem fizjologicznych dawek cukrów.

2.2.3. Metody badawcze zastosowane w pracy „Marathon run-induced changes in the erythropoietin-erythroferrone-hepcidin axis are iron dependent”

Procedury badań

Do badań zrekrutowano czterdziestu jeden mężczyzn, biegaczy-amatorów, w wieku 39.29 ± 8.58 lat, przygotowujących się do startu w Gdańskim maratonie. Spośród całej grupy, wszystkie etapy badań zrealizowało dwudziestu dziewięciu uczestników. Plany treningowe realizowane przez biegaczy przed startem w zawodach uwzględniały 6.39 ± 2.28 h treningów biegowych w tygodniu, ze średnią liczbą pokonanych kilometrów wynoszącą 55.84 ± 19.77 km. Przed rozpoczęciem testów uczestnicy zostali ustnie poinformowani o przebiegu badań. Wszyscy biegacze wyrazili również pisemną zgodę na świadomy udział w badaniu. Ponadto, przed rozpoczęciem badań biegacze uzyskali od lekarzy pisemne potwierdzenie o braku przeciwwskazań do udziału w maratonie.

Próbki krwi

Próbki krwi żyłnej pobierano z żyły łokciowej, do pojemników jednorazowego użytku z prokoagulantem. Pobranie krwi odbyło się trzykrotnie: miesiąc przed maratonem, bezpośrednio po biegu maratońskim oraz dziewięć dni po ukończeniu zawodów. Pobór krwi bezpośrednio po maratonie odbył się niezwłocznie po tym, kiedy biegacze dotarli do mety, zaś pozostałe dwa pobory zrealizowano na czczo, w godzinach porannych. Po pobraniu, próbki wirowano przy 3000 g w 4°C, przez 10 min. Z pobranych próbek wyizolowano surowice, która po przeniesieniu do probówek typu eppendorf została zamrożona w temperaturze -80°C do czasu oznaczeń.

Oznaczenia biochemiczne

Stężenia Hpc, ERFE i HMGB-1 w surowicy określono za pomocą zestawów Cloud-Clone Corp. Ilościowe oznaczanie EPO w surowicy przeprowadzono automatycznie przy użyciu IMMULITE 2000 EPO, testu chemiluminescencyjnego w fazie stałej (IMMULITE 2000, Siemens). W prezentacji danych uwzględniono potencjalne zmiany wartości hematokrytu.

Do oceny obecności mutacji w genie HFE wykorzystano test do genotypowania LightMix HFE H63D S65C C282Y (TibMolbiol), z użyciem aparatu LightCycler 2.0 (Roche). Dwa fragmenty genu HFE poddano amplifikacji metodą Real-Time PCR. Jeden z nich, o długości 354 par zasad obejmujący mutacje H36D oraz S65C, drugi, o długości 276 par zasad, obejmujący mutację C282Y. Genotypowanie wykonano metodą analizy krzywej topnienia.

Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu oprogramowania Statistica 12.0 (Statsoft, Tulsa, OK). Wszystkie wartości wyrażono jako średnią $\pm$ odchylenie standardowe (SD). Do oceny jednorodności dyspersji z rozkładu normalnego użyto testu Shapiro-Wilka. Test Browna-Forsythe'a zastosowano do oceny jednorodności wariancji. W celu uzyskania jednorodnych wyników przeprowadzono analizę wariancji (ANOVA) dla powtarzanych pomiarów oraz test post-hoc Tukeya w celu zidentyfikowania znacząco różnych wyników. W przypadku próbki heterogenicznej zastosowano test ANOVA Friedmana i odpowiedni test post-hoc. Poziom istotności ustalono na $p < 0,05$.

2.2.4. Omówienie wyników pracy “Marathon run-induced changes in the erythropoietin-erythroferrone-hepcidin axis are iron dependent”

Średnie stężenia żelaza, ferrytyny i transferyny oscylowały w standardowym zakresie u wszystkich badanych, z wyjątkiem dwóch, którzy wykazali obniżone stężenia w przypadku żelaza i transferyny. Wzrost stężenia Hpc bezpośrednio po biegu maratońskim odnotowano u czternastu biegaczy. W przypadku piętnastu biegaczy, u których zaobserwowano spadek stężenia Hpc, ujawnił się jednocześnie wzrost stężenia ERFE bezpośrednio po maratonie, jednakże, zmiany te wróciły do wartości bazowych dziewięć dni po zakończeniu zawodów. Fakt ten może sugerować hamujący wpływ ERFE na biosyntezę hepcydyny (Antosiewicz et al. 2013). Ponadto zaobserwowano, iż czynnikiem warunkującym zmiany w stężeniach HpC, EPO i ERFE jest wyjściowe stężenie żelaza. Biegacze posiadający wyjściowe stężenie żelaza $<105 \mu\text{g/Dl}$, charakteryzowali się wzrostem stężenia EPO i ERFE bezpośrednio po maratonie, przy jednoczesnym spadku Hpc.

Szczegółowa analiza wykazała również, że bezpośrednio po maratonie wzrosło stężenie EPO u uczestników charakteryzujących się stężeniem ferrytyny $<70 \text{ ng/ml}$, czego nie zaobserwowano u uczestników posiadających ferrytynę na poziomie $>70 \text{ ng/ml}$. Powyższe wyniki sugerują, że podczas biegu maratońskiego, u biegaczy z niskim poziomem żelaza w surowicy, dochodzi do nasilenia sygnalizacji hipoksycznej oraz do jej spadku w przypadku sportowców z wysokim poziomem żelaza w surowicy. Obserwacje te, potwierdzają zarówno badania na modelach zwierzęcych jak i badania prowadzone na ludziach (Nai et al. 2014; Bosman et al. 2002). Analiza genu HFE ujawniła, że jedenastu z dwudziestu dziewięciu biegaczy było heterozygotami mutacji H63D, zaś osiemnastu biegaczy posiadało gen niezmutowany, inaczej gen typu dzikiego (ang. wild type, WT). W próbkach pobranych dziewięć dni po maratonie zaobserwowano niewielki wzrost stężenia ERFE w grupie WT ($0,17 \pm 0,12$ vs $0,24 \pm 0,15$, $p = 0,01$). Co ciekawe, siedmiu nosicieli mutacji H63D wykazało wzrost stężenia Hpc po maratonie, zaś czterech – spadek. Widoczny był również wzrost markerów odpowiedzi zapalnej i uszkodzenia mięśni – kinazy kreatynowej (CK), leukocytów, neutrofilii i pentraksyny 3. Jednakże, wbrew oczekiwaniom, stężenie białka prozapalnego HMGB-1 nie wzrosło po maratonie. Ponadto poziomy transferyny, TIBC i EPO wzrosły po biegu maratońskim, co może wskazywać na reakcję adaptacyjną na stres wywołaną intensywnym biegiem (Peeling et al. 2014). Uzyskane wyniki potwierdzają wykazany wcześniej hamujący wpływ ERFE na syntezę HpC oraz sugerują, że czynnikami determinującymi zmiany w stężeniach hormonów regulujących metabolizm żelaza są wyjściowe stężenia żelaza oraz ferrytyny.

2.2.5. Metody badawcze zastosowane w pracy „Suplementacja związkami antyoksydacyjnymi w sporcie. Przegląd piśmiennictwa”

W pracy przeglądowej uwzględniono jedenaście badań opublikowanych w latach 1997-2013, prowadzonych zarówno na sportowcach wyczynowych jak i amatorach, w których zastosowano długoterminową suplementację preparatami antyoksydacyjnymi. Minimalny okres suplementacyjny wynosił dwa tygodnie, maksymalny, osiem tygodni. Stosowana suplementacja obejmowała preparaty zawierające: wit. C, połączenie wit. C z kwercetyną / wit.E, CoQ10, Ubiquinol oraz wieloskładnikowe preparaty antyoksydacyjne.

2.2.6. Omówienie wyników pracy „Suplementacja związkami antyoksydacyjnymi w sporcie. Przegląd piśmiennictwa”

W czterech spośród jedenastu uwzględnionych badań zaobserwowano pozytywne efekty suplementacyjne, objawiające się m.in.: zwiększeniem maksymalnej mocy podczas testu wysiłkowego na cykloergometrach czy lepszymi wynikami czasowymi uzyskiwanymi podczas biegu do odmowy na bieżni mechanicznej (Cooke et al. 2008; Alf, Schmidt and Siebrecht 2013). Jednakże, w siedmiu badaniach uzyskane rezultaty były neutralne lub też niekorzystne. Szczególnie interesującymi są spadki ekspresji genów: peroksydazy glutationowej, dysmutazy ponadtlenkowej oraz PGC1- α wskutek ośmiotygodniowego stosowania wit.C w dawce 1 g/d w połączeniu z 300 mg wit.E, czy nasilenie stresu oksydacyjnego na skutek dwumiesięcznej podaży α -tokoferolu w dawce 800 IU/d (Ristow et al. 2009; Nieman et al. 2004). Indukowany wysiłkiem fizycznym stres oksydacyjny, wywołuje reakcję adaptacyjną nasilającą aktywność endogennych systemów antyoksydacyjnych chroniących przed uszkodzeniami oksydacyjnymi. Suplementacja związkami o charakterze przeciwutleniającym może zatem upośledzać funkcjonowanie naturalnych, wewnętrznych barier chroniących przed stresem oksydacyjnym i upośledzać adaptację treningową.

2.3. Wnioski

- Indukowany wysiłkiem fizycznym wzrost stężenia Hpc jest ograniczany wskutek stosowania diety bogatej w cukry proste.
- Dieta bogata we fruktozę stymuluje powysiłkowy wzrost IL-6.
- Stymulowany wysiłkiem i suplementacją fruktozy wzrost stężenia IL-6 nie wiązał się ze wzrostem stężenia Hpc.
- Wyśiłek maratoński powoduje wzrost stężenia EPO.
- U biegaczy z niskim stężeniem żelaza we krwi odnotowano bardziej widoczny wzrost stężenia EPO i ERFE po biegu maratońskim, w stosunku do osób z wysokim stężeniem żelaza.
- U biegaczy z niskim stężeniem ferrytyny obserwowano istotny wzrost EPO po biegu maratońskim, podczas gdy powyższe zmiany nie były widoczne u biegaczy z wysokim stężeniem ferrytyny.
- U biegaczy, u których obserwowano spadek Hpc po biegu maratońskim odnotowano wzrost stężenia ERFE.
- Zaobserwowano, że jedenastu spośród dwudziestu dziewięciu maratończyków było nosicielami zmutowanej formy genu HFE (H63D), jednakże mutacja ta nie miała wpływu na zmiany w metabolizmie żelaza, indukowane wysiłkiem maratońskim.
- Nie ma jednoznacznego stanowiska uczonych w sprawie suplementacji związków antyoksydacyjnych u sportowców.

3. Dissertation summary

This doctoral dissertation is based on a series of three publications under a common title: "Changes in iron metabolism induced by physical effort and diet", consisting of:

- *Suplementacja związkami antyoksydacyjnymi w sporcie: Przegląd piśmiennictwa*, Medycyna Sportowa, 2015, vol. 31, 1, 1-9, doi: 10.5604/1232406X.1150313, Ministerial score – 14pts
- *Simple sugar supplementation abrogates exercise-induced increase in hepcidin in young men*. Journal of the International Society of Sports Nutrition, 2017, vol. 14, 10, 1-5, doi: 10.1186/s12970-017-0169-8, impact factor - 3,135, Ministerial score – 25pts
- *Marathon run-induced changes in the erythropoietin-erythroferrone-hepcidin axis are iron dependent*. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2020, vol. 17, 8, 2781, 1-9, doi: 10.3390/ijerph17082781, impact factor 2,468, Ministerial score — 70pts

3.1 Introduction

The role of iron in human health has been recognized since ancient times. Its numerous applications were already known by Egyptians, Hindus, Greeks and Romans (Woods, Eggleston and Krebs 1970; McDowell 2003). Accounts from the 17th century also suggest that iron was used to treat chlorosis which manifests as green skin, and which was often believed to be caused by iron deficiency (Guggenheim 1995). However, it was not until 1932 when the importance of iron was finally reinforced by the evidence that iron is necessary for the production of haemoglobin which is essential for cellular respiration (Ziegler and Filer 1996).

Iron is a micronutrient involved in a number of processes maintaining homeostasis of the human body, such as cellular respiration, DNA and RNA biosynthesis, regulation of gene expression, and cell proliferation and differentiation (Lieu et al. 2001). In a 2017 report – “Nutritional anaemias: tools for effective prevention and control” the World Health Organization (WHO) suggests that iron deficiency, the leading cause of anaemia in many people, can affect health of up to two billion people, and regardless of negative effects of anaemia, it is associated with delayed cognitive and behavioural development in children, as well as with reduced productivity in adults and impaired cognitive functioning in women (World Health Organization 2017). On the other hand, so-called iron overload is the disorder with equally important health complications described in the literature, which accompanies the most common genetic disorder in the world, that is hereditary haemochromatosis. Increased absorption of iron in the gastrointestinal tract observed in patients with haemochromatosis may lead to “iron overload” which is characterized by accumulation of iron in the liver, pancreas and heart, which in turn leads to the development of disorders such as diabetes, cirrhosis, heart failure or cancer (Pietrangelo 2010; Brissot et al. 2018). Organ damage is believed to be caused by the production of an excess of reactive oxygen species in the presence of excess iron, occurring mainly as a result of Fenton reaction, which is catalysed by ferric ions (Kohgo et al. 2008). The multidirectional action of iron in the human body and numerous negative health consequences resulting from disorders of its metabolism are reflected in the complex, intracellular mechanism of iron level regulation, which is still not fully understood.

Iron is absorbed in duodenal enterocytes, but before that non-haem iron is reduced from the Fe^{3+} to the Fe^{2+} form. Iron can be stored in the enterocytes as ferritin or transferred to the bloodstream by ferroportin. Ferroportin transports reduced iron (Fe^{2+}) which is then oxidized to the Fe^{3+} form by hephaestin or ceruloplasmin and bound to the main iron transporter – transferrin, with

which it is distributed to specific tissues. Hepcidin, a 25-amino acid peptide synthesized in the liver (Ganz 2003), is considered the major regulator of dietary iron absorption and iron release from macrophages to the bloodstream. Hepcidin can also be produced in adipose tissue and tissues of many other organs, including kidneys, stomach, , brain, heart or pancreas (Daher et al. 2019). Studies conducted over the last few years have shown that the synthesis of hepcidin is strongly stimulated by inflammation accompanying intense physical exercise. Interleukin 6 (IL-6), a pro-inflammatory cytokine, plays a key role in this mechanism. Interleukin 6 stimulates the synthesis of hepcidin, which limits iron absorption from the small intestine and reduces the ability of macrophages to recycle iron from old erythrocytes (Peeling et al. 2014). In the analysis of post-exercise urine hepcidin levels in marathon runners, an increase in hepcidin concentration was observed in the majority of the studied women (Roecker et al. 2005). Other publications confirm these changes and highlight the co-occurrence of inflammation in the studied sportswomen (Antosiewicz et al. 2013; Ehn, Carlmark and Höglund 1980). However, there are also reports that find no difference in hepcidin levels in response to exercise (Kasprowicz et al. 2013) . This fact proves that there are other factors influencing hormonal response. The recently discovered hormone erythroferrone (ERFE) and the HMGB-1 protein are the factors that may have an impact on post-exercise hepcidin levels (Kautz et al. 2014; Ranzato, Martinotti and Patrone 2015). What is important, ERFE inhibits hepcidin biosynthesis and its action can be stimulated by erythropoietin (EPO). The suggested mechanism of action of ERFE assumes that increased erythropoiesis, which accompanies regular physical activity provokes the differentiation of erythroblasts, i.e. precursor red blood cells, in the bone marrow and spleen, which increases the production of ERFE and its release into the bloodstream. ERFE has a direct effect on the liver by inhibiting hepcidin production, which in turn increases the amount of iron available for synthesis of new red blood cells (Kautz et al. 2014). Moreover, the relationship between iron metabolism and the EPO-ERFE-Hpc axis is confirmed by the activity of transferrin receptor 2 (Tfr2), which is a component of the erythropoietin receptor complex (EPOR). Animal model analyses suggest that Tfr2 acts as a circulating iron sensor that regulates the sensitivity of EPO and decreases its activity in iron overload (Nai et al. 2015). *In vitro* studies also show that hepatic Tfr2, by promoting iron signalling, stimulates hepcidin synthesis and inhibits the entry of iron into the bloodstream (Nai et al. 2014).

Apart from increased physical activity, the factor that may modulate the inflammation is diet (Galland 2010). In recent years, scientists have been particularly interested in fructose, whose average consumption has quadrupled since the beginning of the 20th century (Jameel 2014). Studies

conducted both *in vitro* and on animal models show that high supply of fructose increases the production of superoxide anion and thus induces oxidative stress, which in turn may increase the production of pro-inflammatory mediators (Cirillo et al. 2009; Delbosc et al. 2005). This fact has been confirmed in human studies, in which high doses of fructose cause an increase of the C-reactive protein levels (hs-CRP) (Jameel et al. 2014). Moreover, due to the fact that fructose is metabolized differently than other sugars, its overconsumption may contribute to negative health consequences. As there are no effective glycolytic checkpoints, hepatic ATP and adenine nucleotide stores may be depleted leading to an increase in uric acid levels in the blood, causing hyperuricemia, which is considered the risk factor of obesity, diabetes, kidney diseases and cardiovascular diseases (Woods, Eggleston and Krebs 1970; Soltani et al. 2013). It is interesting that the abovementioned disorders are accompanied by increased ferritin blood levels (Knovich et al. 2009). This fact gives rise to the assumption that high fructose intake is associated with changes in iron metabolism. *In vitro* studies show that fructose and its metabolites increase the absorption of iron by forming stable complexes with iron. This has been confirmed in animal models in which iron absorption was stimulated by fructose, but not by glucose (Pabón de Roza, VanCampen and Miller 1986; Charley et al. 1963). The effects of high fructose intake on changes in iron metabolism in humans, similarly to the relationship between high-fructose diet and physical exercise are still unknown.

Apart from high-fructose diet, supplementation with antioxidants, which is clearly associated with iron metabolism, has been an often-discussed issue over the last decade, especially among people working in sports. Increased production of reactive oxygen species which accompanies intense physical exercise contributes to the damage of cell structures and may also lead to muscle weakness and fatigue (Allen, Lamb and Westerblad 2008; Powers and Jackson 2008). Interestingly, recent reports show that when under stress ferritin is degraded and iron, which stimulates the production of reactive oxygen species, is released (Borkowska et al. 2011). Although there is no reliable data confirming that disorders of iron metabolism lead to the production of reactive oxygen species during intense physical exercise, cell line model studies suggest that the disorders play an important role in the development of reactive oxygen species (Halon-Golabek et al. 2018). Regardless of the aetiology of free radical reactions, the evident effects of their action are one of the reasons why athletes use antioxidants. Czaja observed that high percentage of Polish medium- and long-distance runners use antioxidants and vitamin C. Similar conclusions were noted during the analysis among the analyses of Finnish Olympians and student-athletes from the University of Nebraska. In addition to the most commonly used vitamin C, a high percentage of athletes use

vitamins A and E (Czaja 2010; Froiland et al. 2004; Heikkinen et al. 2011). Although antioxidant supplements are so popular, the rationale for their supplementation in terms of preventing the effects of increased reactive oxygen species production, as well as their associations with iron metabolism require further research.

Another factor that may influence the post-exercise iron metabolism is the HFE gene mutation, which determines the development of hereditary haemochromatosis, the most common genetic disorder in the Caucasian population. Hereditary haemochromatosis is a liver disease with insufficient production of hepcidin, in the course of which low hepcidin expression increases the activity of ferroportin and leads to increased absorption of dietary iron, which accumulates in tissues and thus causes damage to many organs (Vujić 2014). The three most common mutations in the HFE gene include: **H63D** mutation, **S65C** mutation, and **C282Y** mutation, which is the most frequent polymorphism (European Association for the Study of the Liver 2010). As there is no data on this topic, it seems interesting how intense physical exercise affects iron metabolism in people with HFE mutation and to what changes (if any) in metabolism does the mutation lead to, in comparison to non-carriers?

Research objective

On the basis of the above-mentioned study reports the following research questions were formulated:

- Does a high intake of simple sugars affect post-exercise changes in Hpc and IL-6 levels?
- Will the marathon cause any changes in the EPO, ERFE, Hpc hormonal axis?
- Will the baseline blood iron and ferritin levels determine changes in EPO, ERFE and Hpc levels induced by marathon?
- Will marathon-induced changes in iron metabolism be different for mutant HFE gene carriers than for runners without the mutation?
- Does supplementation with antioxidants in sports make sense?

3.2. Methods, results and discussion

3.2.1. Methods used in the study “Simple sugar supplementation abrogates exercise-induced increase in hepcidin in young men”

Research procedures

A randomized, single-blind crossover study included seventeen healthy men aged 20-25 years, with an average $\text{VO}_2 \text{ max} = 51.06 \pm 8.9 \text{ mL kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$. The subjects were randomized to a group receiving fructose drinks ($n = 9$) or glucose drinks ($n = 8$) in a total amount of 4 g of sugar per kilogram of body weight. During the three-day supplementation period all participants followed a diet with the same macronutrient content and a total caloric value of 3541.90 kcal. After the end of the three-day period participants undergo a one-week „wash-out” during which they kept their routine physical activity and did not change their eating habits. After a one-week break, the procedure was resumed with subjects placed in the other groups. Before the study started, all participants were informed about the aims and risks of this study and provided a written consent to participate in the study, approved by the Bioethics Committee for Scientific Research at the Medical University of Gdańsk.

Cardiac stress test

Before the beginning and after the end of the three-day supplementation period, a stress test with gradually increasing intensity of exercise was performed. The test was continued until the patient requested to stop the exercise (progressive stress test). It was performed in the morning, one hour after breakfast of the same nutritional value for all participants. The test was carried out on a Monark bicycle ergometer with the MetaMAx3B gas analyser by Cortex. Before the actual test started, participants performed a 5-minute warm-up at the intensity of $1.5 \text{ W} \cdot \text{kg}^{-1}$ with a pedalling cadence of 60 rpm. Immediately after the warmup, subjects started a progressive test in which resistance was increased by 25 W/min until the point of volitional exhaustion. The exchange of respiratory gases was measured during the test (Oxycon-Pro, Jaeger-Viasys Health Care, Hochberg, Germany). The O_2 and CO_2 analysers were calibrated before each test using standard gases of known concentrations according to the manufacturer's guidelines.

Blood samples

Venous blood samples were collected from the ulnar vein into disposable tubes with a pro-coagulant. Blood sampling was performed twice: at rest, immediately before starting the stress test, and one hour after its completion. Immediately after collection, the samples were placed on ice and then centrifuged at 3000 g at 4°C for 10 minutes. Sera were isolated from the samples, and, after transferring to eppendorf tubes, they were frozen at -80°C until analysis.

Biochemical testing

Serum hepcidin and IL-6 levels were determined using a commercial ELISA kit (DRG Instruments, Marburg, Germany)

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Statistica 13.1 software. All values were expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD). The Shapiro-Wilk test was used to determine whether the data had a normal distribution. The Brown-Forsythe test was used to confirm homogeneity of variances. For homogeneous variables, an analysis of variance (ANOVA) for repeated measures and Tukey's post-hoc test for unequal sample sizes were performed to identify significantly different results. The Friedman ANOVA test and the Dunn-Bonferroni post-hoc tests were used in heterogeneous samples. The significance level was set at $P < 0.05$.

3.2.2. Results and discussion about the study report “Simple sugar supplementation abrogates exercise-induced increase in hepcidin in young men”

The obtained results show a statistically significant, exercise-induced increase in hepcidin levels in subjects on a standard diet. This increase was not found in subjects on high-fructose or high-glucose diets. One of the hypotheses explaining the inhibition of hepcidin synthesis says that fructose forms stable complexes with iron, thus increasing its absorption. This mechanism has been confirmed in *in vitro* studies and in animal models, in which iron absorption was stimulated by fructose (Pabón de Roza, VanCampen and Miller 1986), but, unlike in our study, such an effect was not observed for glucose. Resting hepcidin levels remained the same in all sugar-supplemented

groups. Moreover, a statistically significant increase in IL-6 was observed in people receiving fructose, but not in those receiving glucose. This observation is consistent with reports saying that high fructose intake increases C-reactive protein (hs-CRP) level, which may be a proof of intensified inflammation and, potentially, affect iron metabolism (Jameel et al. 2014). In order to confirm this hypothesis, however, it is necessary to conduct further research, particularly with the use of physiological doses of sugars.

3.2.3. Methods used in the study “Marathon run-induced changes in the erythropoietin- erythroferrone-hepcidin axis are iron-dependent”

Research procedures

As many as forty-one male amateur runners, aged 39.29 ± 8.58 years, preparing to start in Gdansk Marathon were included in the study. Twenty-nine of them completed all study stages. Training schedule included 6.39 ± 2.28 hours of running a week, with a mean number of kilometres covered 55.84 ± 19.77 km. Before the tests started, all participants were informed orally about the course of the study. All runners gave their written, informed consent to participate in the study. Before the initiation of the study all participants obtained a written, medical opinion certifying that their participation in the marathon is not contraindicated.

Blood samples

Venous blood samples were collected from the ulnar vein into disposable tubes with a pro-coagulant. Blood samples were collected three times: one month before the marathon, immediately after the marathon run and nine days after the end of the competition. Blood sampling after the marathon run was performed immediately after the runners reached the finish line and the other two fasting blood samples were collected in the morning. The samples were then centrifuged at 3000 g at 4°C for 10 minutes. Sera were isolated from the collected samples, and after transferring to eppendorf tubes, they were frozen at -80°C until the time of analysis.

Biochemical analysis

Serum Hpc, ERFE and HMGB-1 levels were determined using Cloud-Clone Corp kits. Quantitative determinations of EPO in the serum were performed automatically using IMMULITE 2000 EPO, a solid-phase chemiluminescent assay (IMMULITE 2000, Siemens). Potential changes in the haematocrit value were taken into consideration in data presentation

The HFE genotype was determined using LightMix Kit HFE H63D S65C C282Y (TibMolbiol) with LightCycler 2.0 (Roche). Two fragments of the HFE gene were PCR-amplified using Real-Time PCR method. One of them, 354 bp in length, including H36D and S65C mutations, whereas the other, 276 bp in length, including C282Y mutation. Genotyping was performed with melting curve analysis.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Statistica 12.0 software (Statsoft, Tulsa, OK). All values were expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD). The Shapiro-Wilk test was used to determine whether the data had a normal distribution. The Brown-Forsythe test was used to confirm homogeneity of variances. For homogeneous results, an analysis of variance (ANOVA) for repeated measures and Tukey's post-hoc test for unequal sample sizes were performed to identify significantly different results. The Friedman ANOVA test and the Dunn-Bonferroni post-hoc tests were used in heterogeneous samples. The significance level was set at $P < 0.05$.

3.2.4. Results and discussion about the study report „Marathon run-induced changes in the erythropoietin-erythroferrone-hepcidin axis are iron-dependent”

Mean iron, ferritin, and transferrin levels were within the standard range in all subjects except for two with reduced iron and transferrin levels. Post-marathon Hpc levels were increased in fourteen runners. Fifteen runners with a decrease in Hpc levels were found to have ERFE levels increased immediately after the marathon but the values returned to baseline levels nine days later. This fact may suggest an inhibitory effect of ERFE on hepcidin biosynthesis (Antosiewicz et al. 2013). It has also been observed that changes in HpC, EPO and ERFE levels depend on the baseline iron levels. In athletes whose serum iron levels were below 105 $\mu\text{g/dl}$, serum EPO and ERFE levels increased after the marathon run, whereas Hpc levels decreased.

Detailed analysis showed that athletes with ferritin levels <70 ng/mL had increased EPO levels right after the marathon, but it was not observed in athletes with ferritin levels >70 ng/mL. These results suggest that during a marathon run, the hypoxic signalling is augmented in runners with low serum iron levels and reduced in athletes with high serum iron levels, which has been confirmed in animal models and human studies (Nai et al. 2014; Bosman et al. 2002). Analysis of the HFE gene revealed that eleven of twenty-nine runners were heterozygotes for H63D mutation and eighteen runners carried the unchanged form of the gene, that is the wild type gene (WT). A slight increase in ERFE levels was found in samples collected in the WT HFE gene group nine days after the marathon (0.17 ± 0.12 vs. 0.24 ± 0.15 , $P = 0.01$). Interestingly, seven of the H63D mutation carriers demonstrated an increase in Hpc levels after the marathon, while four showed a decrease. Furthermore, an increase in the markers of inflammatory response and muscle damage (creatine kinase (CK), leukocytes, neutrophils, and pentraxin 3) was observed. However, contrary to the expectations, the levels of HMGB-1, a pro-inflammatory protein, did not increase after the marathon. Finally, transferrin, TIBC and EPO levels increased after the marathon run, which may indicate a stress-adaptive response induced by intense running (Peeling et al. 2014). The obtained results confirm the previously demonstrated inhibitory effect of ERFE on HpC synthesis and suggest that baseline iron and ferritin levels are factors determining changes in the levels of hormones regulating iron metabolism.

3.2.5. Methods used in the study “Supplementation with antioxidants in sports: Literature review”

The review included 11 studies published in the years 1997-2013, conducted both on professional athletes and amateurs who used long-term supplementation with antioxidants. The minimum supplementation period was 2 weeks, the maximum - 8 weeks. The supplementation used included preparations containing vitamin C, a combination of vitamin C with quercetin / vitamin E, CoQ10, α -tocopherol, Ubiquinol and multi-component antioxidant preparations.

3.2.6. Results and discussion about the study “Supplementation with antioxidants in sports: Literature review”

Positive supplementation effects were observed in four out of eleven included studies. These effects included increased maximum power evaluated in cardiac stress tests performed on cycloergometers and better results obtained on a treadmill (longer time to request cessation of the

workout) (Cooke et al. 2008; Alf, Schmidt and Siebrecht 2013). In seven studies, however, the results were neutral or unfavourable. Particularly interesting is the decreased expression of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and PGC1- α genes as the result of eight weeks of supplementation with vitamin C in a dose of 1 g/d in combination with 300 mg of vitamin E, or the increase in oxidative stress as the result of a two-month intake of α -tocopherol in a dose of 800 IU/d (Ristow et al. 2009; Nieman et al. 2004). Physical exercise-induced oxidative stress provokes an adaptive reaction increasing the activity of endogenous antioxidant systems which protect the body against oxidative damage. Supplementation with antioxidants may therefore impair the functions of natural, internal barriers protecting against oxidative stress and impair training adaptation.

3.3. Conclusions

- Exercise-induced increase in Hpc level is limited by the simple sugar-rich diet.
- Fructose-rich diet stimulates post-exercise increase in IL-6 levels.
- Exercise and fructose supplementation stimulated increase in IL-6 concentration was not associated with increase of Hpc concentration.
- Marathon effort increases EPO levels.
- Runners with low blood iron levels had a more pronounced increase in EPO and ERFE levels after the marathon run compared to those with high iron levels.
- Runners with low ferritin levels showed a significant increase in EPO levels after the marathon run. These changes were not observed in runners with high ferritin levels.
- An increase in ERFE levels was observed in runners with a decrease in Hpc levels after the marathon run.
- Eleven out twenty-nine marathon runners carried a mutant form of the HFE gene (H63D) but it had no effect on exercise-induced changes in iron metabolism.
- There is no consensus among researchers regarding the supplementation of antioxidants in athletes.

4. Piśmiennictwo / References

Antosiewicz, J. *et al.* (2013) 'Repeated "all out" interval exercise causes an increase in serum hepcidin concentration in both trained and untrained men', *Cellular Immunology*. doi: 10.1016/j.cellimm.2013.06.006.

Alf, D., Schmidt, M. E. and Siebrecht, S. C. (2013) 'Ubiquinol supplementation enhances peak power production in trained athletes: A double-blind, placebo controlled study', *Journal of the International Society of Sports Nutrition*. doi: 10.1186/1550-2783-10-24.

Allen, D. G., Lamb, G. D. and Westerblad, H. (2008) 'Skeletal muscle fatigue: Cellular mechanisms', *Physiological Reviews*. doi: 10.1152/physrev.00015.2007.

Borkowska, A. *et al.* (2011) 'P66Shc mediated ferritin degradation-A novel mechanism of ROS formation', *Free Radical Biology and Medicine*. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.04.045.

Bosman, D. R. *et al.* (2002) 'Erythropoietin response to hypoxia in patients with diabetic autonomic neuropathy and non-diabetic chronic renal failure', *Diabetic Medicine*. doi: 10.1046/j.1464-5491.2002.00634.x.

Brissot, P. *et al.* (2018) 'Haemochromatosis', *Nature Reviews Disease Primers*. doi: 10.1038/nrdp.2018.16.

Charley, P. J. *et al.* (1963) 'Chelation of iron by sugars', *BBA - Biochimica et Biophysica Acta*. doi: 10.1016/0006-3002(63)91264-2.

Cirillo, R. *et al.* (2009) 'Ketoheokinase-dependent metabolism of fructose Induces proinflammatory mediators in proximal tubular cells', *Journal of the American Society of Nephrology*. doi: 10.1681/ASN.2008060576.

Cooke, M. *et al.* (2008) 'Effects of acute and 14-day coenzyme Q10 supplementation on exercise performance in both trained and untrained individuals', *Journal of the International Society of Sports Nutrition*. doi: 10.1186/1550-2783-5-8.

Czaja, J. (2010) 'Bromatologiczna ocena czynników optymalizujących dietę osób aktywnych fizycznie'' Rozprawa doktorska

- Daher, R. *et al.* (2019) 'Extrahepatic hepcidin production: The intriguing outcomes of recent years', *World Journal of Clinical Cases*. doi: 10.12998/wjcc.v7.i15.1926.
- Delbosc, S. *et al.* (2005) 'Involvement of oxidative stress and NADPH oxidase activation in the development of cardiovascular complications in a model of insulin resistance, the fructose-fed rat', *Atherosclerosis*. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2004.10.018.
- Ehn, L., Carlmark, B. and Höglund, S. (1980) 'Iron status in athletes involved in intense physical activity', *Medicine and Science in Sports and Exercise*. doi: 10.1249/00005768-198021000-00012.
- European Association for the Study of the Liver (2010) 'EASL clinical practice guidelines for HFE hemochromatosis', *Journal of Hepatology*. doi: 10.1016/j.jhep.2010.03.001.
- Froiland, K. *et al.* (2004) 'Nutritional Supplement Use among College Athletes and Their Sources of Information', *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*. doi: 10.1123/ijsnem.14.1.104.
- Galland, L. (2010) 'Diet and inflammation', *Nutrition in Clinical Practice*. doi: 10.1177/0884533610385703.
- Ganz, T. (2003) 'Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation', *Blood*. doi: 10.1182/blood-2003-03-0672.
- Guggenheim, K. Y. (1995) 'Chlorosis: The Rise and Disappearance of a Nutritional Disease', *The Journal of Nutrition*. doi: 10.1093/jn/125.7.1822.
- Halon-Golabek, M. *et al.* (2018) 'hmSOD1 gene mutation-induced disturbance in iron metabolism is mediated by impairment of Akt signalling pathway', *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*. doi: 10.1002/jcsm.12283.
- Heikkinen, A. *et al.* (2011) 'Use of dietary supplements in Olympic athletes is decreasing: A follow-up study between 2002 and 2009', *Journal of the International Society of Sports Nutrition*. doi: 10.1186/1550-2783-8-1.
- Jameel, F. *et al.* (2014) 'Acute effects of feeding fructose, glucose and sucrose on blood lipid levels and systemic inflammation', *Lipids in Health and Disease*. doi: 10.1186/1476-511X-13-195.

- Kasprowicz, K. *et al.* (2013) 'Running a 100-km ultra-marathon induces an inflammatory response but does not raise the level of the plasma iron-regulatory protein hepcidin', *Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*.
- Kautz, L. *et al.* (2014) 'Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism', *Nature Genetics*. doi: 10.1038/ng.2996.
- Knovich, M. A. *et al.* (2009) 'Ferritin for the clinician', *Blood Reviews*. doi: 10.1016/j.blre.2008.08.001.
- Kohgo, Y. *et al.* (2008) 'Body iron metabolism and pathophysiology of iron overload', *International Journal of Hematology*. doi: 10.1007/s12185-008-0120-5.
- Lieu, P. T. *et al.* (2001) 'The roles of iron in health and disease', *Molecular Aspects of Medicine*. doi: 10.1016/S0098-2997(00)00006-6.
- McDowell, L. R. (2003) *Minerals in Animal and Human Nutrition: Second Edition*, *Minerals in Animal and Human Nutrition: Second Edition*. doi: 10.1016/B978-0-444-51367-0.X5001-6.
- Nai, A. *et al.* (2014) 'The erythroid function of transferrin receptor 2 revealed by Tmprss6 inactivation in different models of transferrin receptor 2 knockout mice', *Haematologica*. doi: 10.3324/haematol.2013.103143.
- Nai, A. *et al.* (2015) 'The second transferrin receptor regulates red blood cell production in mice', *Blood*. doi: 10.1182/blood-2014-08-596254.
- Nieman, D. C. *et al.* (2004) 'Vitamin E and immunity after the Kona Triathlon World Championship', *Medicine and Science in Sports and Exercise*. doi: 10.1249/01.MSS.0000135778.57355.CA.
- Pabón de Roza, M., VanCampen, D. and Miller, D. D. (1986) 'Effects of some carbohydrates on iron absorption.', *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*.
- Pietrangelo, A. (2010) 'Hereditary hemochromatosis: Pathogenesis, diagnosis, and treatment', *Gastroenterology*. doi: 10.1053/j.gastro.2010.06.013.

- Powers, S. K. and Jackson, M. J. (2008) 'Exercise-induced oxidative stress: Cellular mechanisms and impact on muscle force production', *Physiological Reviews*. doi: 10.1152/physrev.00031.2007.
- Peeling, P. *et al.* (2014) 'Iron status and the acute post-exercise hepcidin response in athletes', *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0093002.
- Ranzato, E., Martinotti, S. and Patrone, M. (2015) 'Emerging roles for HMGB1 protein in immunity, inflammation, and cancer', *ImmunoTargets and Therapy*. doi: 10.2147/itt.s58064.
- Ristow, M. *et al.* (2009) 'Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi: 10.1073/pnas.0903485106.
- Roecker, L. *et al.* (2005) 'Iron-regulatory protein hepcidin is increased in female athletes after a marathon', *European Journal of Applied Physiology*. doi: 10.1007/s00421-005-0055-y.
- Ross, A. C. *et al.* (2012) *Modern nutrition in health and disease: Eleventh edition, Modern Nutrition in Health and Disease: Eleventh Edition*.
- Soltani, Z. *et al.* (2013) 'Potential role of uric acid in metabolic syndrome, hypertension, kidney injury, and cardiovascular diseases: Is it time for reappraisal?', *Current Hypertension Reports*. doi: 10.1007/s11906-013-0344-5.
- Woods, H. F., Eggleston, L. V. and Krebs, H. A. (1970) 'The cause of hepatic accumulation of fructose 1-phosphate on fructose loading.', *The Biochemical journal*. doi: 10.1042/bj1190501.
- World Health Organization (2017) 'Nutritional anaemias: Tools for effective prevention and control', *WHO Document Production Services, Geneva, Switzerland, 2017*.
- Ziegler, E. E and Filer L. J (1996) 'Present knowledge in nutrition'. 7th ed. Washington DC: ILSI Press; 1996. pp. 278–92.

5. Załączniki

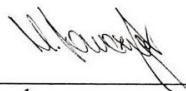
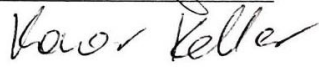
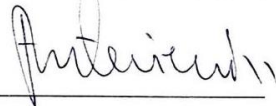
- Oświadczenia współautorów
- Publikacja nr 1 pt.: „Suplementacja związkami antyoksydacyjnymi w sporcie: Przegląd piśmiennictwa”
- Publikacja nr 2 pt.: „Simple sugar supplementation abrogates exercise-induced increase in hepcidin in young men”
- Publikacja nr 3 pt.: „Marathon Run-induced Changes in the Erythropoietin-Erythroferrone-Hepcidin Axis are Iron Dependent”

Gdańsk, 9.10.2020 r.

OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORÓW PUBLIKACJI

Tomeczyk. M., Kaczor K., Antosiewicz J. (2015). Suplementacja związkami antyoksydacyjnymi w sporcie: Przegląd piśmiennictwa. Medycyna Sportowa, 31(1), 1-9. doi: 10.5604/1232406X.1150313

Niniejszym oświadczamy, że indywidualny wkład w powstanie ww publikacji jest następujący:

autor	wkład %	opis*	podpis
Maja Tomeczyk	80	E, F	
Katarzyna Kaczor	10	E	
Jędrzej Antosiewicz	10	E	

* A – przygotowanie projektu badania, B – przeprowadzanie badań, C – analiza statystyczna, D – interpretacja wyników, E – przygotowanie publikacji, F – opracowanie piśmiennictwa, G – pozyskanie funduszy

podpis doktoranta



podpis promotora

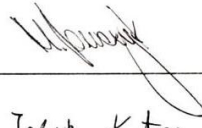
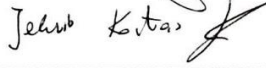
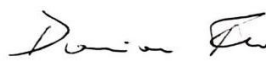
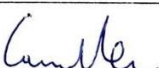
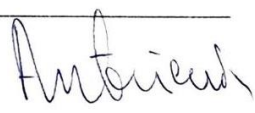


Gdańsk, 9.10.2020 r.

OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORÓW PUBLIKACJI

Tomezyk, M., Kortas, J., Flis, D., Skrobot, W., Camilleri, R., Antosiewicz, J. (2017). Simple sugar supplementation abrogates exercise-induced increase in hepcidin in young men. Journal of the International Society of Sports Nutrition, 14(10), 1-5. doi: 10.1186/s12970-017-0169-8

Niniejszym oświadczamy, że indywidualny wkład w powstanie ww publikacji jest następujący:

autor	wkład %	opis*	podpis
Maja Tomezyk	55	A,B,D,E, F	
Jakub Kortas	10	C	
Damian Flis	10	B	
Wojciech Skrobot	2	E	
Rafał Camilleri	2	E	
Jędrzej Antosiewicz	21	A,D,E,F,G	

* A – przygotowanie projektu badania, B – przeprowadzanie badań, C – analiza statystyczna, D – interpretacja wyników, E – przygotowanie publikacji, F – opracowanie piśmiennictwa, G – pozyskanie funduszy

podpis doktoranta



podpis promotora

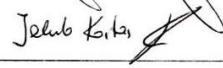
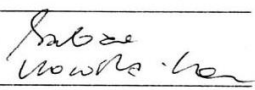
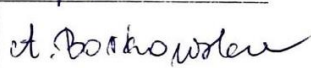
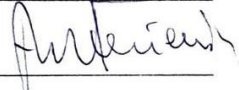


Gdańsk, 9.10.2020 r.

OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORÓW PUBLIKACJI

Tomezyk, M., Kortas, J., Flis, D., Kaczorowska-Hac, B., Grzybkowska, A., Borkowska, A., Lewicka, E., Dabrowska-Kugacka, A., Antosiewicz, J. (2020). Marathon run-induced changes in the erythropoietin-erythroid hormone-hepcidin axis are iron dependent. International Journal of Environmental Research and Public Health, 17(8), 2781. <https://doi.org/10.3390/ijerph17082781>

Niniejszym oświadczamy, że indywidualny wkład w powstanie ww publikacji jest następujący:

autor	wkład %	opis*	podpis
Maja Tomezyk	50	B, D, E, F	
Jakub Kortas	5	C	
Damian Flis	6	B	
Barbara Kaczorowska-Hac	5	B	
Agata Grzybkowska	2	B	
Andżelika Borkowska	2	B	
Ewa Lewicka	5	A	
Alicja Dabrowska-Kugacka	5	A	
Jędrzej Antosiewicz	20	A, E	

* A – przygotowanie projektu badania, B – przeprowadzanie badań, C – analiza statystyczna, D – interpretacja wyników, E – przygotowanie publikacji, F – opracowanie piśmiennictwa, G – pozyskanie funduszy

podpis doktoranta



podpis promotora



Zaangażowanie Autorów

- A – Przygotowanie projektu badawczego
B – Zbieranie danych
C – Analiza statystyczna
D – Interpretacja danych
E – Przygotowanie manuskryptu
F – Opracowanie piśmiennictwa
G – Pozyskanie funduszy

Author's Contribution

- A – Study Design
B – Data Collection
C – Statistical Analysis
D – Data Interpretation
E – Manuscript Preparation
F – Literature Search
G – Funds Collection

Maja Tomczyk^{1(E,F)}, Katarzyna Kaczor^{2(B,E)}, Jędrzej Antosiewicz^{2(E)}

¹ Katedra Nauk Przyrodniczych Akademii Wychowania Fizycznego i Sportu, Gdańsk, Polska

² Zakład Bioenergetyki i Fizjologii Wysiłku Fizycznego Gdański Uniwersytet Medyczny, Gdańsk Dębinki, Polska

¹ The Chair of Natural Sciences, University of Physical Education and Sport, Gdańsk, Poland

² Department of Bioenergetics and Physiology Exercise, Medical University of Gdańsk, Poland

SUPLEMENTACJA ZWIĄZKAMI ANTYOKSYDACYJNYMI W SPORCIE. PRZEGLĄD PIŚMIENNICTWA ANTIOXIDANTNS IN SPORT NUTRITION – LITERATURE REVIEW

Słowa kluczowe: suplementy sportowe, antyoksydanty, wydolność fizyczna
Key words: sport supplements, antioxidants, exercise capacity

Streszczenie

Chęć zwiększenia możliwości wysiłkowych organizmu oraz zapobieganie negatywnym konsekwencjom wynikającym z wysokich obciążeń treningowych, skłaniają sportowców i osoby aktywne fizycznie do sięgania po różnego rodzaju suplementy diety. Wśród dozwolonych suplementów o naukowo potwierdzonej skuteczności oraz preparatów, które nie wykazują korzystnych efektów działania, znajdują się te, których wpływ na organizm ludzki pozostaje niejednoznaczny. Do grupy B suplementów sportowych sklasyfikowanych przez Australijski Instytut Sportu, co do skuteczności których nie ma wystarczających dowodów naukowych, zalicza się preparaty antyoksydacyjne. Poniższa praca przedstawia mechanizmy działania i rolę substancji pro- i antyoksydacyjnych w organizmie osób o zwiększonej aktywności fizycznej oraz przegląd badań oceniających wpływ związków antyoksydacyjnych na możliwości wysiłkowe.

Summary

The desire for enhancing body's natural capacity and preventing it from negative consequences as a result of intense physical trainings have become one of the reasons why athletes and physically active people administer different types of dietary supplements. Besides the scientifically proven supplements and the ones that do not show the beneficial effects, there are some preparations, whose impact of the body remains unclear. In particular, group B sport supplements, which is classified by the Australian Institute of Sport, includes antioxidant preparations and there is only limited scientific evidence, associated with their efficiency. This work presents the mechanisms of action, the role of pro- and antioxidant substances in people with increased physical activity and the review of studies investigating the effect of antioxidant compounds on exercise capacity.

Word count: 3930
Tables: 2
Figures: 6
References: 31

Adres do korespondencji / Address for correspondence

Maja Tomczyk
Katedra Nauk Przyrodniczych Zakład Biochemii Akademii Wychowania Fizycznego i Sportu
80-336 Gdańsk, ul. K. Górskiego 1, e-mail: tomczykmaja@gmail.com

Otrzymano / Received 29.10.2014 r.
Zaakceptowano / Accepted 14.02.2015 r.

Reaktywne formy tlenu – efekt zwiększonego wysiłku fizycznego

Antyoksydanty stanowią grupę związków chemicznych, które przeciwdziałają zachodzącym w komórkach reakcjom utleniania, mogącym prowadzić do strukturalnych i funkcjonalnych zaburzeń organizmu. Substancjami inicjującymi oksydację, wchodzącymi w reakcje ze składnikami komórek i w konsekwencji mogącymi uszkadzać ich funkcje, są reaktywne formy tlenu (z ang. ROS). Wśród reaktywnych form tlenu należy wymienić związki wolnorodnikowe, posiadające w swojej budowie jeden niesparowany elektron (min. *anionorodnik ponadtlenkowy i rodnik wodoronadtlenkowy*) oraz związki niebędące rodnikami (*tlon singletowy, ozon, nadtlenek wodoru*) [1].

Produkcja niewielkich ilości reaktywnych form tlenu w organizmie jest naturalnym zjawiskiem fizjologicznym, niezbędnym do regulacji procesów metabolicznych, ekspresji genów czy też procesów naprawczych komórek. W wyniku zaburzeń przemian wewnątrzkomórkowych oraz czynników zewnętrznych, dochodzić może do ich nagromadzenia i wywołania tzw. stresu oksydacyjnego, który charakterystyczny jest m.in. dla chorób neurodegeneracyjnych, miażdżycy, cukrzycy czy nowotworów. Co więcej, wydaje się, iż procesy wolnorodnikowe odgrywają bezpośrednią rolę w starzeniu się organizmu [2,3,4,5]. Zjawisko stresu oksydacyjnego i nasilonej produkcji reaktywnych form tlenu obserwowane jest również w przypadku zwiększonego wysiłku fizycznego, co po raz pierwszy na początku lat 80. ubiegłego stulecia wykazali Davis i współpracownicy [5,6]. Źródłem substancji prooksydacyjnych w mięśniach szkieletowych są w głównej mierze procesy oddychania komórkowego przebiegające w mitochondriach oraz przemiany katalizowane przez oksydazę NADPH, oksydazę ksantynową oraz syntazę tlenu azotu. Większość przetwarzanego w mitochondriach tlenu redukowana jest do wody, podczas gdy około 1% ulega niepełnej redukcji z wytworzeniem reaktywnych form tlenu. Dodatkowo generatorami wolnych rodników powstających w trakcie pracy mięśniowej są procesy autooksydacji katecholamin, uszkodzenia białek zawierających w swojej strukturze żelazo (hemoglobina, mioglobina) oraz komórki fagocytyczne [2,3,7].

Stosowanie antyoksydantów wśród sportowców

Liczne badania wykazały, że nasilona produkcja reaktywnych form tlenu, towarzysząca długotrwałemu, intensywnemu wysiłkowi fizycznemu, wywołuje uszkodzenia składników komórkowych, jak również przyczynia się do wystąpienia zjawiska osłabienia i zmęczenia mięśniowego [4,8,9].

Fakt ten stał się jednym z powodów, dla którego sportowcy zaczęli sięgać po witaminy o charakterze antyoksydacyjnym. Wysokie spożycie suplementów antyoksydacyjnych zaobserwowano w badaniach oceny częstości stosowania suplementacji witaminowej przez biegaczy średnio- i długodystansowych autorstwa Czaji, wedle których do najczęściej stosowanych witamin, oprócz kwasu foliowego, należą wit. C oraz wit. A wraz z wit. E. W grupie 88 sportowców (56 mężczyzn i 32 kobiety) codzienną suplementację preparatami z wit. C zadeklarowało 28,2% kobiet i 33,9% mężczyzn.

Reactive oxygen species – the effect of increased physical activity

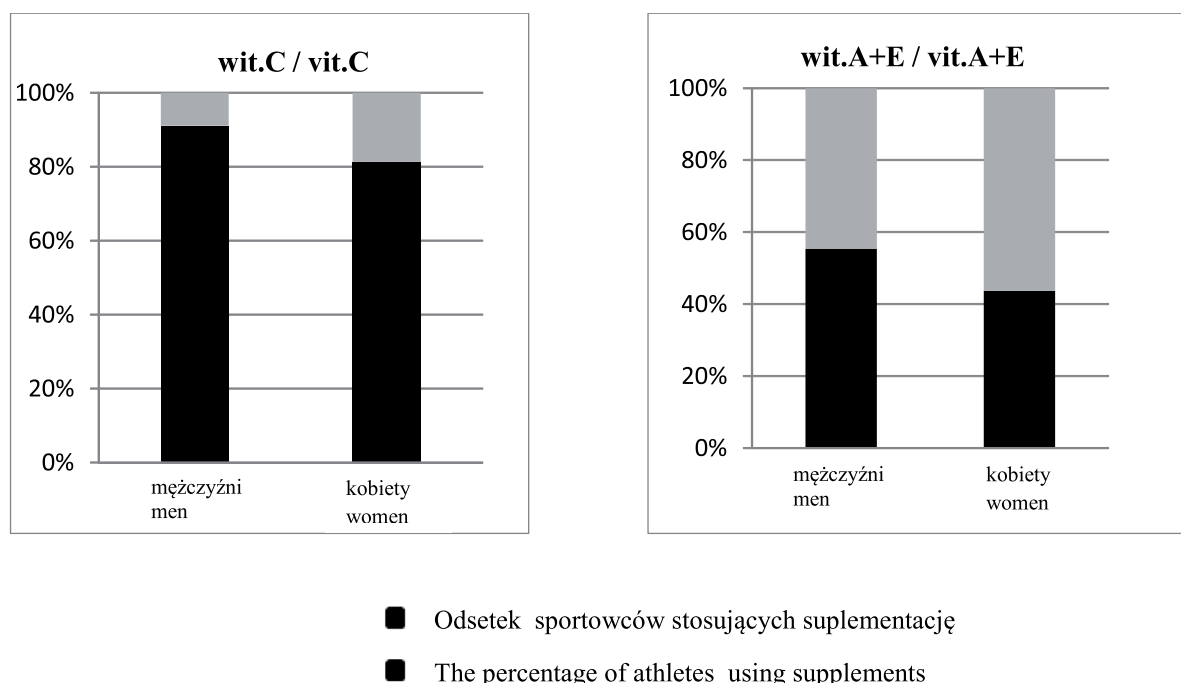
Antioxidants are a group of compounds that counteract the oxidation reactions occurring in cells, which can lead to structural and functional disturbances of the body. The substances that initiate oxidation reactions fall in the reactions with components of cells and consequently, may damage their functions. These are called reactive oxygen species (ROS). Among the reactive oxygen species, there are free radicals with one unpaired electron in their structure (superoxide anion and hydroxyl radical) and non-radical compounds (singlet oxygen, ozone, hydrogen peroxide) [1].

The formation of small amounts of reactive oxygen species is a natural physiological phenomenon essential for regulating the metabolic processes of gene expression and cell repair processes. Some intracellular changes and external factors may lead to their accumulation and induce oxidative stress, which is characteristic of conditions such as neurodegenerative diseases, atherosclerosis, diabetes and cancer. Moreover, it seems that the free-radical processes play a direct role in the aging of the human body [2,3,4,5]. The phenomenon of increased oxidative stress and the production of reactive oxygen species is also observed in the case of increased physical activity, which was demonstrated for the first time in the early 1980s by Davis and colleagues [5,6].

The increase of pro-oxidative substances in skeletal muscle is predominantly due to extending the cellular respiration in mitochondria, and the reaction catalyzed by NADPH oxidase, xanthine oxidase and nitric oxide synthase. Oxygen, which is mainly processed in the mitochondria, is later reduced to water, while around 1% of the reduction reaction is incomplete and induces the formation of a reactive oxygen species. In addition, the free radicals generated during muscle work processes cause the autooxidation of catecholamines, protein damage on structures containing iron (hemoglobin, myoglobin) and phagocytic cells [2,3,7].

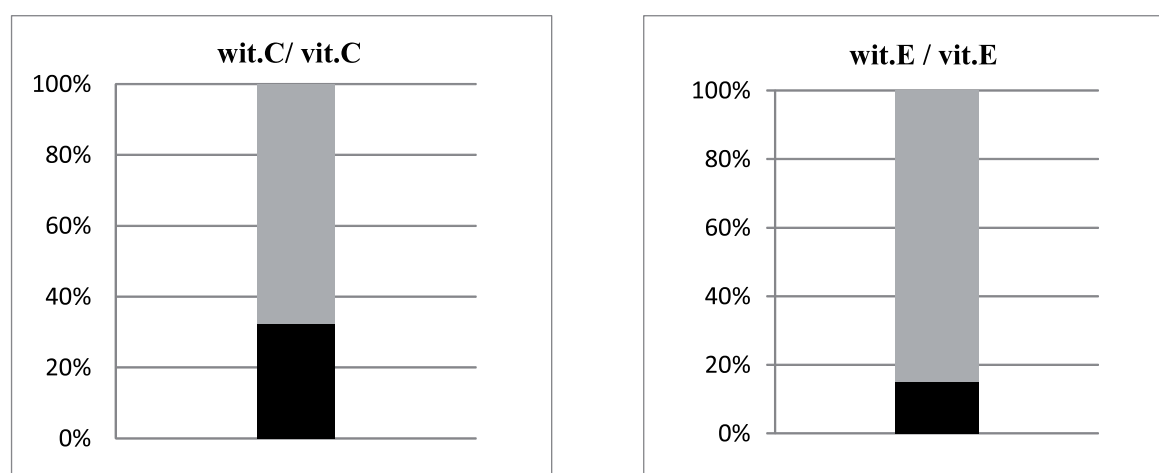
The use of antioxidants among athletes

Numerous studies have shown that the increased production of reactive oxygen species during intense and long-term physical exertion causes damage to cellular components, as well as contributes to muscle weakness and fatigue [4,8,9]. This fact has become one of the reasons why athletes began to use antioxidant vitamins. A high intake of antioxidant supplements was observed in studies evaluating the frequency of the use of vitamin supplementation for medium or long distance runners by Czaja. According to this research, the most common vitamins consumed, other than folic acid, were vitamin C and vitamin A with vitamin E. In a group of 88 athletes (56 men and 32 women), 28.2% of the women and 33.9% of the men reported that they used vitamin C supplements daily. The percentage of runners taking supplements of vitamins A and E was 15.6% for women and 7.1% for men [10].



Ryc.1,2. Częstotliwość stosowania wit.C (Ryc. 1) i wit.A+E (Ryc. 2) wśród 88 polskich biegaczy średnio i długodystansowych według Czaji [10]

Fig.1,2. Frequency of use vitamin C (Fig. 1) and Vitamin A + E (Fig. 2) among 88 Polish average and long distance runners according to Czaja [10]



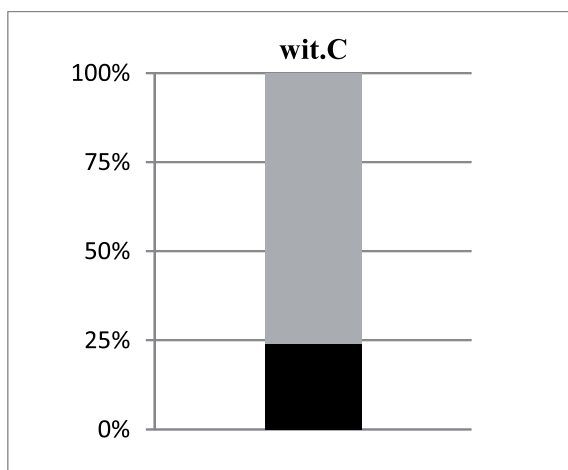
Ryc. 3,4. Częstotliwość stosowania wit.C i wit.E wśród 203 sportowców akademickich według Froilanda i wsp. [11]

Fig. 3,4. Frequency of use vit.C and vit.E among 103 academic athletes according to Froiland et al. [11]

Odsetek biegaczy stosujących suplementy oparte o wit. A+E wynosił 15,6 % w przypadku kobiet i 7,1% w przypadku mężczyzn [10].

Podobnych danych dostarcza analiza stosowania suplementów wśród sportowców akademickich Froilanda i współautorów, z której wynika, iż wit C, E i wit. A/B-karoten były suplementowane przez kolejno 32%, 15% i 10% spośród 203 uczestników badania [11]. Dodatkowo wysokie spożycie wit. C na przestrzeni lat 2002 i 2008-2009 wśród fińskich olimpijczyków wykazało badanie Heikkinena i współpracowników. Spośród 446 badanych w roku 2002, od-

Similar data were obtained from the analysis of sport supplements by Frøiland and co-authors, which showed that vitamin C, E and vitamin A (B-carotene) were supplemented by 32%, 15% and 10% of the 203 participants in the study, respectively [11]. In addition, a high intake of vitamin C among Finnish Olympians between 2002 and 2008 to 2009 was found by Heikkinen and colleagues. Of the 446 respondents in 2002, the percentage of athletes consuming vitamin C supplementation was 28%, while in 2008/2009, 24% of the athletes reported using such supplements [12].



Ryc. 5. Częstość stosowania wit.C wśród 372 fińskich Olimpijczyków według Heikkinena i wsp. [12]
 Fig. 5. Frequency of use vit.C among 272 according to finnish olympians according to Heikkinen et al. [12]

setek sportowców spożywających preparaty z wit. C wynosił 28%, podczas gdy na przełomie lat 2008/2009 suplementację zadeklarowało 24% z 372-osobowej grupy sportowców [12]. Wysokie spożycie preparatów antyoksydacyjnych w grupie polskich sportowców wyczynowych, w tym siatkarzy i biegaczy narciarskich, zaobserwowali również Frączak i wsp. oceniający stosowanie preparatów wspomagających możliwości wysiłkowe [13]. Suplementacja preparatami o charakterze antyoksydacyjnym jest działaniem, które sugeruje się osobom aktywnym fizycznie, pozostającym na nieodpowiednio zbilansowanej diecie, która ogranicza konsumpcję warzyw i owoców, a tym samym naraża na niedobory wspomnianych witamin [14].

Suplementacja antyoksydantami a wydolność fizyczna

Obecnie część badań wskazuje na możliwość zaburzenia funkcjonowania naturalnych barier ochronnych organizmu i ograniczenia adaptacji wysiłkowej na skutek suplementacji związkami antyoksydacyjnymi [15,16]. Organizm ludzki wyposażony jest w szereg związków hamujących lub usuwających produkowane reaktywne formy tlenu: peroksydazę glutationową katalizującą rozkład nadtlenu wodoru, dysmutazę ponadtlenkową unieszkodliwiającą anionorodnik ponadtlenkowy czy ceruloplasminę-białko enzymatyczne zapobiegające powstawaniu anionorodnika ponadtlenkowego. Wskazuje się, że sportowcy mają lepiej rozwiniętą wewnętrzną barierę chroniącą przed związkami wolnorodnikowymi niż osoby prowadzące siedzący tryb życia [3,17]. Ristow i współpracownicy zaobserwowali, że zwiększony stres oksydacyjny spowodowany wysiłkiem fizycznym stanowi bodziec aktywujący wewnątrzkomórkowy sygnał prowadzący do wzrostu aktywności enzymów antyoksydacyjnych. W trakcie 4-tygodniowej próby wysiłkowej, której poddani zostali zarówno trenujący, jak i nieaktywni mężczyźni, wykazano wzrost ekspresji enzymów peroksydazy glutationowej i dysmutazy ponadtlenkowej. Efekt korzystnego oddziaływania na mechanizmy obronne

A high intake of antioxidants by a Polish group of athletes, including volleyball players and cross-country skiers, was also observed by Frączak et al., in the evaluation of the use of preparations supporting exercise capacity [13]. Supplementation with antioxidants is suggested to those who are physically active, but who are consuming an inadequately balanced diet limited in fruit and vegetable consumption, increasing their risk of vitamin deficiency. [14].

Supplementation with antioxidants and exercise capacity

Some research suggests that there is a possibility of dysfunction in the body's immune reactions, as well as a decrease in the body's ability to adapt to exercise, as a result of supplementation with antioxidants [15,16]. The human body is equipped with a number of compounds that inhibit or remove produced reactive oxygen species such as glutathione peroxidase (responsible for the decomposition of hydrogen peroxide), superoxide dismutase (which neutralizes superoxide radicals) or ceruloplasmin-enzymatic proteins, (which prevents from the formation of superoxide anion). It has been shown that athletes have better-developed internal barriers against free radical compounds than those who are leading sedentary lifestyles [3,17]. Ristow and colleagues observed that the increased oxidative stress caused by physical effort is the stimulus that activates the intracellular signaling leading to increase activity of the antioxidant enzymes. During the 4-week test, which included both trained and inactive men, the increased gene expression of glutathione peroxidase and superoxide dismutase were demonstrated. There was no evidence of benefit on the defense mechanisms among the participants whose physical activity was supported

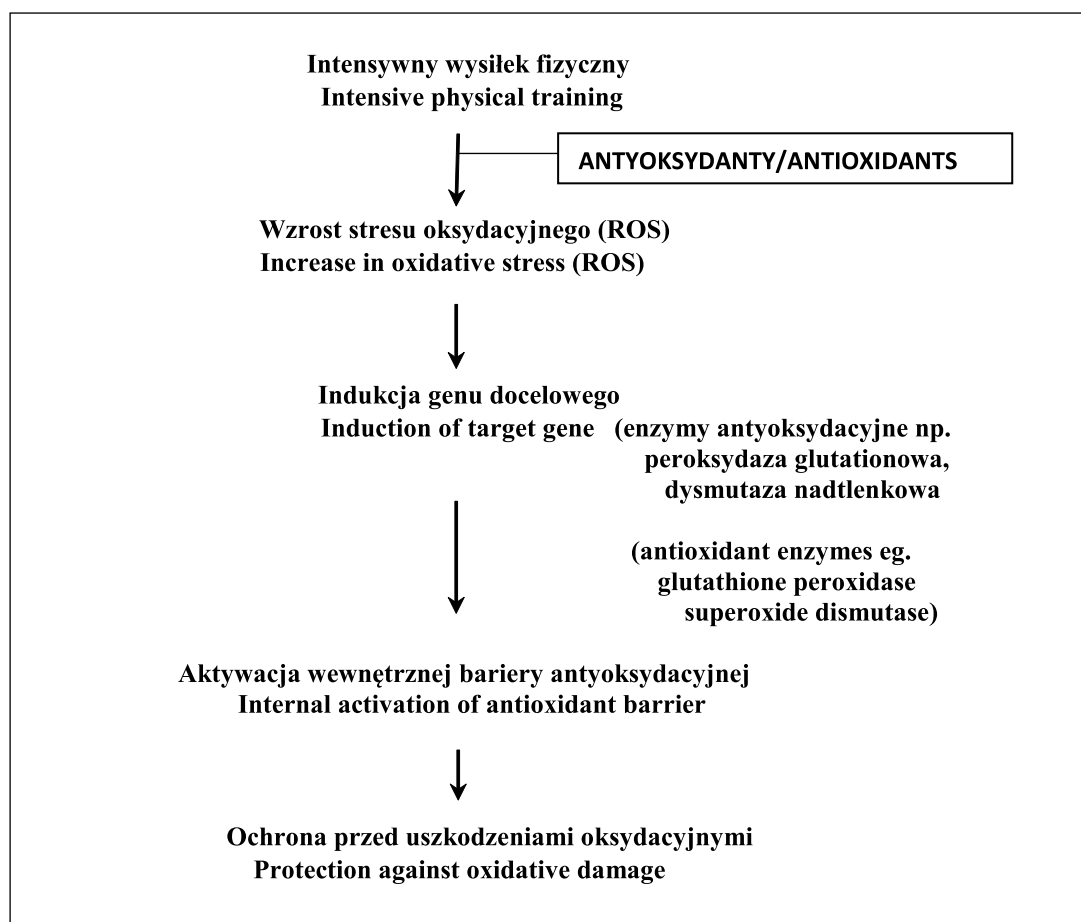
nie uwidocznił się wśród uczestników, których aktywność fizyczna wsparta była suplementacją wit. C.

Trening połączony z podażą antyoksydantów nie wpłynął również na zmiany w parametrach insulino-wrażliwości komórkowej, które zaobserwowano w przypadku zastosowania samego wysiłku fizycznego [16]. Część badaczy sugeruje, że suplementacja antyoksydantami jest działaniem mogącym ograniczyć możliwości wysiłkowe.

W badaniach Malm'a i współpracowników, 22-tygodniowa suplementacja ubichinonem (koenzymem Q10) przyczyniła się do wzrostu wydolności beztlenowej, jednak zaobserwowane zmiany były mniejsze w porównaniu z grupą otrzymującą placebo [18]. Gomez i współpracownicy poddali treningowi na cykloergometrach zdrowych mężczyzn o niskiej aktywności fizycznej, spośród których połowę suplementowano wit. C. Zarówno przed, jak i po 8 tygodniach ćwiczeń, badanym określono maksymalny pobór tlenu (VO_{2max}). Jakkolwiek obie grupy charakteryzowały się wzrostem pułapu tlenowego pod koniec trwania okresu treningowego, lecz większe zmiany uwidoczniły się w przypadku grupy, w której nie zastosowano suplementacji witaminowej [15].

O wątpliwym wpływie związków antyoksydacyjnych na zdrowie świadczy również metaanaliza Bjelakovic'a i współautorów. Analiza 68 randomizowanych badań nie dostarczyła przekonujących dowodów pro-

by suplementacją z witaminą C. Zwiększenie wrażliwości obserwowane po treningu zostało zniesione u osób suplementowanych antyoksydantami [16]. Niektórzy badacze sugerują, że suplementacja antyoksydantami może ograniczyć wydolność. W badaniu przeprowadzonym przez Malm i współpracowników, dwadzieścia dwa tygodnie suplementacji ubichinonem (koenzym Q10) przyczyniły się do wzrostu wydolności, ale obserwowane zmiany były mniejsze niż u grupy otrzymującej placebo [18]. W innym badaniu Gomez i współpracownicy trenowali zdrowych mężczyzn o niskim poziomie aktywności fizycznej na ergometrach, a połowę z nich suplementowali witaminą C. Przed i po ósmym tygodniu treningu wykonano test maksymalnego poboru tlenu (VO_{2max}). Choć w obu grupach nastąpił wzrost wydolności, to większe zmiany obserwowano w grupie, która nie była suplementowana witaminą C [15]. W metaanalizie Bjelakovic i autorzy kwestionowali również wpływ antyoksydantów na zdrowie. Ich analiza sześćdziesięciu osiem randomizowanych badań nie dostarczyła przekonujących dowodów na korzyści suplementacji. W przypadku witamin A, E, C, beta-karotenu i seleniu, w niektórych przypadkach wskazywano na zwiększone ryzyko śmiertelności [19]. Mimo wielu badań sugerujących korzyści z antyoksydantami, istnieją również doniesienia o korzyściach z suplementacji witaminą C.



Ryc. 6. Mechanizm wpływu aktywności fizycznej na zjawiska wolnorodnikowe na podstawie Ristowa i wsp. [16]
Fig. 6. The impact of physical activity on free radical reactions based on Ristow et al. [16]

drowotnego oddziaływania suplementów antyoksydacyjnych: wit. A, E, C, B-karotenu i seleniu. W przypadku B-karotenu i wit. A wskazano również na możliwe zwiększenie ryzyka śmiertelności [19].

Pomimo wielu przesłanek o negatywnym wpływie związków antyoksydacyjnych na parametry wydolności fizycznej, istnieją również doniesienia o korzystnych efektach suplementacji, co widoczne jest na przykładzie najnowszych badań z wykorzystaniem su-

ficial effects of supplementation, which can be seen in recent studies using CoQ10 supplementation [20, 21]. Pre-periods and intensive workouts involve the induction of inflammation in the body, which is a consequence of increased oxidative stress and may contribute to an increased risk of disease, particularly due to respiratory infections [22,23]. It is possible that supplementation with antioxidant compounds during intense physical activity provides protective effects

Tab. 1. Badania wskazujące niekorzystne i neutralne efekty suplementacji związkami antyoksydacyjnymi w oparciu o wyniki testów wydolnościowych i aktywność enzymów antyoksydacyjnych

Tab. 1. Studies showing neutral and negative effects of antioxidant supplementation based on performance test and antioxidant enzyme activity

Uczestnicy badania Participants in the study	Zastosowana suplementacja Applied supplementation	Wyniki Results	Autorzy Authors
20 trenujących i 20 nieaktywnych fizycznie mężczyzn w wieku 25-35 lat 20 trainees and 20 physically inactive men aged 25-35 years	wit.C (1000 mg/d) + wit.E (400 IU/d) przez okres 4 tygodni vit.C (1000 mg / d) + vit.E (400 IU / d) for period of 4 weeks	Spadek ekspresji genów: peroksydazy glutationowej(GPx1) dysmutazy nadadtlenkowej (SOD1,SOD2) zarówno u trenujących jak i nietrenujących uczestników Decrease in the expression of genes: glutathione peroxidase (GPx1) superoxide dismutase (SOD1, SOD2) in both the trainees and untrained participants	Ristow i/and wsp/al.,2009
14 nietrenujących mężczyzn w wieku 27-36 lat 14 untrained men aged 27-36 years	wit.C (1000mg/d) przez okres 8 tygodni vit.C (1000 mg / d) for period of 8 weeks	Niższy maksymalny pobór tlenu (VO _{2max}) w grupie suplementowanej w porównaniu do grupy placebo Lower maximal oxygen uptake (VO _{2max}) in the supplemented group compared to the placebo group	Gomez-Cabrera i/and wsp/al., 2008
18 nieaktywnych fizycznie mężczyzn wieku 20-34 lat 18 physically inactive men aged 20-34 years	CoQ10 (120mg/d) przez okres 22 dni CoQ10 (120mg / d) for period of 22 days	Słabsze wyniki testu wydolności beztlenowej oraz niższa średnia moc jazdy w grupie suplementowanej w porównaniu z placebo Weaker anaerobic capacity test results and lower average power output in the supplemented group compared with placebo	Malm i/and wsp/al.,1997
38 triathlonistów w wieku 34-36 lat 38 triathletes at the aged 34-36 years	α - tokoferol (800 IU/d) przez okres 2 miesięcy α-tocopherol (800 IU / d) for period of 2-months	Wzrost stresu oksydacyjnego i stężenia cytokin prozapalnych w grupie suplementowanej w porównaniu z placebo Increase in oxidative stress and proinflammatory cytokine concentrations in the supplemented group compared with placebo	Nieman i/and wsp/al.,2004
15 aktywnych fizycznie mężczyzn i kobiet w wieku 30-65 lat 15 physically active men and women aged 30-65	Ubiquinol (300mg/d) przez okres 4-tygodni Ubiquinol (300mg / d) for period of 4-weeks	Brak wpływu na wyniki testów wydolności tlenowej i beztlenowej No effect on test scores of aerobic and anaerobic capacity	Bloomer i/and wsp/al.,2012
27 mężczyzn o zróżnicowanej aktywności fizycznej w wieku 19-30 lat 27 men of different physical capacities at age 19-30 years	α tokoferol (885 mg/d) przez okres 2-tygodni α-tocopherol (885 mg / d) for period of 2-weeks	Brak wpływu na wyniki testów wysiłkowych No effect on capacity test	Viitala i/and wsp/al.,2004
60 mężczyzn o zróżnicowanej aktywności fizycznej 60 men of different physical capacities	wit. C (200mg/d) + kwercetyna (500mg/d) przez okres 8 tygodni vit. C (200mg / day) + quercetin (500 mg / d) during 8 weeks	Brak wpływu na wyniki testu wysiłkowego „do odmowy” No effect on the performance test results 'to refuse '	Askari i/and wsp/al.,2012

plementacji CoQ10 [20,21]. Dodatkowo okresy przedstartowe i intensywne treningi wiążą się z indukcją stanu zapalnego w organizmie, który jest konsekwencją wzrostu stresu oksydacyjnego. Przyczynić się on może do zwiększonego ryzyka zachorowań w szczególności na schorzenia dróg oddechowych [22,23]. Możliwe, że suplementacja związkami antyoksydacyjnymi w okresie wzmożonego wysiłku fizycznego wykaże działanie protekcyjne i ograniczy ryzyko pojawienia się symptomów chorobowych.

and reduces the risk of disease. However, it is important to note that the antioxidant compounds are in Group B of sport supplements according to the classification of the Australian Institute of Sport, meaning that there is insufficient scientific evidence as to their effectiveness. Moreover, it is repeatedly emphasized that the biggest contributor to the increase in exercise capacity of athletes is consuming an optimal diet, rather than using vitamin or mineral supplements [24, 25,26].

Tab. 2. Badania wskazujące korzystne efekty suplementacji związkami antyoksydacyjnymi w oparciu o wyniki testów wydolnościowych i reakcje wolnorodnikowe

Tab. 2. Studies showing beneficial effects of antioxidant supplementation based on the results of maximal exercise stress test and free radical reactions

Uczestnicy badania Participants in the study	Zastosowana Suplementacja Supplementation	Wyniki Results	Autorzy Authors
22 trenujących i 19 nieaktywnych fizycznie kobiet i mężczyzn w wieku 26-34 lat 22 trainees and 19 physically inactive men and women aged 26-34 years	CoQ10 (200mg/d) przez okres 14dni CoQ10 (200mg / d) for period of 14 days	Wydłużenie czasu testu wysiłkowego „do odmowy” Prolongation of the performance test 'to refuse'	Cooke i/and wsp/al.,2008
30 aktywnych fizycznie mężczyzn w wieku 45-65lat 30 physically active men aged 45-65 years	60-dniowa suplementacja preparatem o składzie: 2,4 mg likopenu 30 mg izoflawonów sojowych 60-day supplementation with the mixture: 2.4 mg lycopene 30 mg soy isoflavones	Zmniejszenie peroksydacji lipidów osocza i pobudzenie szlaku naprawy DNA Reduction in plasma lipid peroxidation and stimulation of DNA repair pathway	Giacomo i/and wsp/al.,2009
100 aktywnych fizycznie kobiet i mężczyzn, w tym uczestnicy Igrzysk Olimpijskich 100 physically active women and men, including members of the Olympic Games	Ubiquinol (300mg/d) przez okres 6-tygodni Ubiquinol (300mg / d) for period of 6-weeks	Zwiększenie maksymalnej mocy jazdy podczas testu wysiłkowego na cykloergometrach Increase in the maximum power during exercise test on cycloergometers	Alf i/and wsp/al.,2013
24 aktywnych fizycznie mężczyzn 24 physically active men	6-tygodniowa suplementacja preparatem o składzie: 150 mg wit. C, 24 mg a-tokoferolu 14,40 mg b-karotenu 80 mg selenu 6-week supplementation with the following compounds: 150 mg vit. C 24 mg a-tocopherol 14.40 mg b-carotene 80 mg selenium	Nieznamienisty wzrost ilości wykonywanej pracy w ostatnim etapie testu wydolności tlenowej Insignificant increase in the amount of work performed in the last stage of the aerobic fitness test	Poprzęcki i/and wsp/al.,2003

Należy jednak pamiętać, iż związki antyoksydacyjne pozostają do tej pory w grupie B suplementów sportowych według klasyfikacji Australijskiego Instytutu Sportu, a więc w kategorii związków, co do skuteczności których nie ma wystarczających dowodów naukowych. Ponadto, tak jak jest to wielokrotnie podkreślane, to optymalna dieta, nie zaś stosowanie środków wspomagających możliwości wysiłkowych czy związków witaminowo- mineralnych, w największym stopniu przyczynia się do wzrostu wydolności fizycznej sportowców [24,25,26].

Podsumowanie

Zwiększona produkcja wolnych rodników jest naturalnym zjawiskiem fizjologicznym, które towarzyszy intensywnemu wysiłkowi fizycznemu. Częstym działaniem wśród sportowców chcących zapobiec negatywnym skutkom reakcji wolnorodnikowych jest stosowanie preparatów antyoksydacyjnych. Niektóre dane doświadczalne wskazują, że stosowanie przeciwutleniaczy przez osoby aktywne fizycznie może prowadzić do zaburzenia funkcjonowania naturalnych barier obronnych organizmu i ograniczenia możliwości wysiłkowych, jednak istnieją również doniesienia wskazujące na korzystne oddziaływanie antyoksydantów u ludzi poddanych wysiłkowi fizycznemu. Analizując zasadność suplementacji antyoksydantami w sporcie należy zwrócić uwagę na fakt, iż dawki preparatów wykorzystywane podczas badań niejednokrotnie przekraczają ilości fizjologiczne. Dodatkowo, istnieje stosunkowo mała liczba badań oceniających wpływ stosowania antyoksydantów na wydolność osób aktywnych fizycznie, zaś dostępne publikacje skupiają się przeważnie na wit. C, A i E pomijając inne związki antyoksydacyjne, takie jak kwas alfa lipoowy, polifenole, antocyjany, organiczne związki siarki i inne. Wysunięcie jednoznacznych wniosków co do efektów suplementacji przeciwutleniaczami jest zatem niemożliwe. Interesujący wydaje się również aspekt wpływu naturalnych źródeł antyoksydantów na parametry wydolności fizycznej sportowców, który jak dotąd nie został dogłębnie zbadany. Temat suplementacji związkami antyoksydacyjnymi pozostawia tym samym wiele pytań bez odpowiedzi. Jak różne dawki preparatów antyoksydacyjnych wpływają na zmiany w wynikach testów wydolnościowych? Które spośród substancji antyoksydacyjnych wywołają najsilniejszy efekt fizjologiczny? Czy zasadna jest suplementacja sportowców związkami antyoksydacyjnymi w okresie przedstartowym?

Z uwagi na powyższe niewiadome oraz wiele innych pytań dotyczących suplementacji antyoksydantami, istnieje konieczność prowadzenia dalszych badań, które wykluczą bądź potwierdzą skuteczność preparatów antyoksydacyjnych i naturalnych źródeł przeciwutleniaczy w podnoszeniu wydolności fizycznej sportowców.

Summary

An increase in the production of free radicals during intense physical exertion is a natural physiological phenomenon. A common behaviour among athletes who want to avoid the negative effects of free radical reactions is the use of antioxidant supplements. Some experimental data reveal that physically active people who consume antioxidants may have an increase in the functions of the greater body's natural defense barriers, reducing the possibility of oxidative stress. Analyzing the effectiveness of antioxidant supplementation in sport performance, it should be noted that the doses used in the studies often exceed the amount of physiological values. There is a relatively small number of studies evaluating the effect of antioxidants on the performance of people who are physically active. There are also few available publications that focus solely on vitamins C, A and E, and ignoring other antioxidant compounds such as: alpha-lipoic acid, polyphenols, anthocyanins, organic sulfur compounds, and others. Firm conclusions about the effects of antioxidant supplementation are therefore, impossible. The impact of natural sources of antioxidants on the physical performance of athletes also seems to be an interesting aspect which has not been thoroughly investigated. Thus, the study of the effects of supplementation with antioxidant compounds leaves many unanswered questions. Some of these include how different doses of antioxidants affect changes in maximal exercise test results, which of the antioxidative substances induce the strongest physiological effect, and whether there are benefits to using antioxidant supplements during pre-competition periods.

In view of these uncertainties and many other questions about supplemented antioxidants, there is a need for further research to refute or confirm the effectiveness of antioxidant preparations and natural sources of antioxidants in improving the physical performance of athletes.

Piśmiennictwo / References

1. Puzanowska-Tarasiewicz H, Kuźmicka I, Tarasiewicz M. Antyoksydanty a reaktywne formy tlenu. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*. 2010,1,9-14.
2. Powers S K, Deruisseau K C, Hamilton J Q, Hamilton K L. Dietary antioxidants and exercise. *Journal of Sports Sciences*, 2004, 22, 81–94.
3. Puzanowska-Tarasiewicz H, Starczewska B, Kuźmicka L. Reaktywne formy tlenu. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*. 2008, 4, 1007–101.

4. Harman D. Aging: A Theory based on free radical and radiation. Available online at URL: <http://geronj.oxfordjournals.org/> (access: 2011.02.11).
5. Davies, K. J., Quintanilha, A., Brooks, G. A. and Packer L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1982, 107, 1198–1205.
6. Vina J et al. Free radicals in exhaustive physical exercise. Mechanism of production, and protection by antioxidants. *IUBMB Life*, 2000, 50, 271–277.
7. Clarkson P, Thompson H. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *American Journal of Clinical Nutrition*, 2000, 72, 637–646.
8. Allen D, Lamb G, Westerblad H. Skeletal Muscle Fatigue: Cellular Mechanisms. *Physiological Reviews*. 2008, 88, 287–332.
9. Powers S K, Jackson J. Exercise-Induced Oxidative Stress. Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production. *Physiological Review*, 2008, 88, 1243–1276.
10. Czaja J. Bromatologiczna ocena czynników optymalizujących dietę osób aktywnych fizycznie. Rozprawa doktorska, Gdańsk 2010.
11. Froiland K, Koszewski W, Hingst J, Kopecky L. Nutritional supplement use among college athletes and their sources of information. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*. 2004, 14, 104–20.
12. Heikkinen A. Use of dietary supplements in Olympic athletes is decreasing: a follow-up study between 2002 and 2009. *Journal of the International Society of Sports Nutrition* 2011, 8, 1.
13. Frączak B, Gacek M, Grzelak A. Żywieniowe wspomaganie zdolności wysiłkowych w grupie sportowców wyczynowych. *Problemy Higieny i Epidemiologii*. 2012, 93, 817–827.
14. Powers S. Antioxidant supplements for athletes: sense or nonsense? *Sport Nutrition Conference Zurich 2010 Materials*. Meyer&Meyer Sport, Aachen, 2010, 20–1.
15. Gomez-Cabrera M et al. Oral administration of vitamin C decreases muscle mitochondrial biogenesis and hampers training-induced adaptations in endurance performance. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2008, 87, 142–9.
16. Ristow M, Zarse K, Oberbach A, Klötting N, Birringer M, Kiehntopf D, Stumvoll M, Kahne R, Blüher M. Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proceedings of the National Academy of the United States of America*. 2009, 106, 8665–8670.
17. Kanter M. Free radicals, exercise and antioxidant supplementation *Proceedings of the Nutrition Society*, 1998, 57, 9–13.
18. Malm C, Svensson M, Ekblom B, Sjodin B. Effects of ubiquinol-10 supplementation and high intensity training on physical performance in humans. *Acta Physiologica Scandinica* 1997, 161, 379–84.
19. Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud L L, Simonetti R G, Gluud C. Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 2007, 28, 842–57.
20. Alf D, Schmidt M, Siebrecht S. Ubiquinol supplementation enhances peak power production in trained athletes. A double-blind, placebo controlled study. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*. 2013, 10, 24.
21. Cooke M, Iosia M, Buford T, Shelmadine B, Hudson G, Kerkick Ch, Rasmussen Ch, Greenwood M, Leutholtz B, Willoughby D, Kreider R. Effects of acute and 14-day coenzyme Q10 supplementation on exercise performance in both trained and untrained individuals. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*. 2008, 5, 8.
22. Woods J et al. Exercise, Inflammation, and Innate Immunity. *Immunology And Allergy Clinics of North America*. 2009, 29, 381–393.
23. Engebretsen L, Soligard T, Steffen K, et al. Sports injuries and illnesses during the London Summer Olympic Games 2012. *British Journal of Sports Medicine*, 2013, 47, 407–414.
24. Australian Institute of sport. AIS supplement group classification. <http://www.ausport.gov.au/ais/nutrition/supplements/classification>.
25. Marczevska J. Suplementy diety/odżywki. Available online at URL: http://www.anty doping.pl/pl/informacje_dla_sportowcow/suplementy_diety_odzywki.
26. Australian Institute of Sport. Competition and training: What the priorities for recovery nutrition. http://www.ausport.gov.au/ais/nutrition/factsheets/competition_and_training/recovery_nutrition.
27. Nieman D. Vitamin E and Immunity after the Kona Triathlon World Championship *Medicine and Science in Sport and Exercise*, 2004, 36, 1328–35.
28. Blomer R. Impact of Oral Ubiquinol on Blood Oxidative Stress and Exercise Performance. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2012.
29. Viitala P. The effects of antioxidant vitamin supplementation on resistance exercise induced lipid peroxidation in trained and untrained participants. Available at URL: <http://www.lipidworld.com/content/3/1/14>. (access: 2004.06.05).
30. Poprzęcki S. Wpływ suplementacji witaminami antyoksydacyjnymi na zdolności wysiłkowe i system obrony antyoksydacyjnej u młodych mężczyzn. *Medycyna Sportowa*. 2003, 19, 6, 207–216.
31. Giacomo C, Acquaviva R, Sorrenti V, Vanella A et al. Oxidative and antioxidant status in plasma of runners: effect of oral supplementation with natural antioxidants. *Journal of Medicinal Food*. 2009, 12, 1, 145–150.

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Simple sugar supplementation abrogates exercise-induced increase in hepcidin in young men

Maja Tomczyk¹, Jakub Kortas², Damian Flis³, Wojciech Skrobot⁴, Rafal Camilleri¹ and Jędrzej Antosiewicz^{1*} 

Abstract

Background: At present many young people experience too much body iron accumulation. The reason of this phenomenon is not clear. There is accumulating evidences that not proper diet and lack of exercise could be a main contributing factors. This investigation assessed the effects of a diet rich in simple sugars (glucose or fructose) on exercise-induced hepcidin which is hormone regulating iron metabolism.

Methods: A group of physically active young men completed an incremental exercise test before and after a 3-day diet supplemented with fructose (4 g/kg BM) or glucose (4 g/kg BM). After a 1-week break, they crossed over to the alternate mode for the subsequent 3-days period. Venous blood samples were collected before and after 1 h exercise and were analysed for serum hepcidin, IL-6, CRP, iron, and ferritin. The physiological response to exercise was also determined.

Results: The concentration of hepcidin increased 1 h after exercise for the baseline test ($p < 0.05$), whereas no changes in hepcidin were observed in men whose diet was supplemented with fructose or glucose. Blood IL-6 increased significantly after exercise only in subjects supplemented with fructose. Changes in hepcidin did not correlate with shifts in serum IL-6.

Conclusions: These data suggest that protective effects of exercise on excess iron accumulation in human body which is mediated by hepcidin can be abrogated by high sugar consumption which is typical for contemporary people.

Keywords: Iron, Metabolism, Ferritin, CRP, Diet

Background

Iron plays a key role in most of processes in the human body, including respiration, DNA biosynthesis, regulation of gene expression and many others. Metabolically active iron is a component of enzymes, including enzymes involved in DNA synthesis, mitochondrial and detoxifying enzymes and many more [1]. This could be the reason why many people think that if we consume or accumulate more iron is better. It is important to note that iron can be very toxic. The involvement of iron in many physiological processes is mainly related to its ability to gain and lose electrons. For example, iron in the mitochondrial respiratory chain, as a part of cytochromes, transfers

electrons from NADH to oxygen. Conversely, free iron can stimulate the formation of reactive oxygen species and participate in damage to cellular structures, such as DNA, lipids or proteins [2]. Iron has been shown to mediated inflammation process induced by exercise [3]. Ferritin is a protein that stores iron and protects against its toxicity. In addition, an increase in free iron, also called the labile iron pool (LIP), induces an adaptive response, which leads to an increase in intracellular ferritin [4]. Despite this, there are several reports demonstrating that stored iron can have deleterious effects on human health and fitness [2, 5]. For example, high body iron stores were associated with low cardiovascular fitness in young men [6]. The exact mechanism of iron toxicity is not well understood, but iron bound to transferrin or ferritin does not stimulate reactive oxygen species (ROS) formation. However, non-transferrin bound iron was observed in

* Correspondence: jant@gumed.edu.pl

¹Department of Biochemistry, Gdansk University of Physical Education and Sport, Kazimierza Gorskiego 1, 80-336 Gdansk, Poland
Full list of author information is available at the end of the article



diabetic persons [7]. In addition, experiments performed in cell culture or animals demonstrated that during stress conditions when protein kinases are activated, ferritin undergoes degradation, leading to the release of iron and increased iron-dependent ROS formation [8]. These and other studies indicate two important things: first that stored iron is not safe and second that the amount of stored iron can determine its toxicity [9]. Therefore, identifying the mechanism responsible for excess iron accumulation may be crucial for a better understanding of the pathomechanisms of iron-related morbidities.

Among factors that can influence body iron accumulation, are exercise and diet.

A diet rich in iron may certainly contribute to iron accumulation. Moreover, there are reports demonstrating that simple sugars can influence intestinal iron absorption, thereby modifying body iron stores. For example, animals on diets supplemented with fructose accumulate more iron in the liver. Because the diet of modern people is rich in sugar, mainly due to the high consumption of soft drinks and added sugar in many foods, it is important to know its effects on iron metabolism.

Conversely, exercise may cause a decrease in body iron stores. For example, decrease in body iron stores was observed in elderly women after 32 weeks of Nordic walking training [10]. By contrast, physical inactivity, which has been recognized as epidemic in modern societies, may also have an impact on iron metabolism [11, 12]. Regular exercise reduces body iron stores; therefore, the lack of exercise may be responsible for body iron accumulation [10, 13]. The effect of exercise on iron metabolism may be mediated by an increase in the hepcidin concentration [14]. Hecpudin is a 25 aa peptide that inhibits intestinal iron absorption or its release from storage tissues, such as the liver and other organs [15]. The purpose of this study was to re-examine the role of simple sugar in a diet on exercise induced changes in iron metabolism.

Any factor that modifies the effects of exercise on blood hepcidin may contribute to impaired iron metabolism. In our study, we hypothesized that a diet rich in simple sugars (glucose and fructose) may modify the effect of exercise on blood hepcidin.

Furthermore, blood ferritin is a good marker of body iron stores if inflammation is not present.

Methods

Subjects

The study involved 17 healthy, physically active but not highly trained, college-aged men (Table 1). The study protocol used a randomised, crossover, blind design. Study subjects performed exercise test after 3 days of control diet and then were randomised to either 3 days of diet supplemented with fructose (4 g/kg BM) or glucose (4 g/kg BM), and then after a 1-week break, crossed

Table 1 Anthropometric and physiological characteristics of participants ($n = 17$)

Variable	X	SD	Me	V	Confidence interval	
					−95%	+95%
Age [years]	21,12	1,11	21	5,26	20,55	21,69
Weight [kg]	77,6	5,56	77,3	7,17	74,74	80,46
Height [cm]	183	5,36	183	2,93	180,24	185,76
Fat [%]	12,21	3,34	10,8	27,4	10,49	13,92
FFM [kg]	68,19	6,28	69,2	9,21	64,97	71,42
TBW [kg]	49,95	4,59	50,6	9,2	47,59	52,31
VO _{2max} [mL · kg ^{−1} · min ^{−1}]	51,06	8,9	49	17,43	46,48	55,63

Abbreviations: X means, SD standard deviation, Me median, V coefficient of variation, BMI Body Mass Index, Fat fat mass, Fat % percentage of body fat, FFM free fat mass, TBW total body water, VO_{2max} maximal oxygen uptake expressed in relatively values, Pmax maximal power

over to the alternate mode for the subsequent 3-day period. During the 1-week break participants maintained their daily routines and diet was not controlled. The participants were fully informed and gave written informed consent to participate in this study as approved by the Medical Research Ethics Committee of the Medical University of Gdansk in Poland. Details that might disclose the identity of the subjects under study have been omitted.

Diet

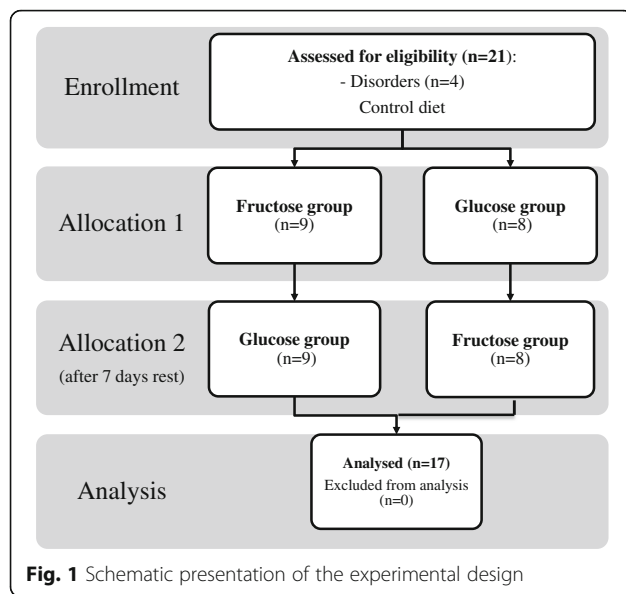
The nutritional components of the diet are presented in Table 1. Participants ate 5 meals a day at set times over a period of 3 days. The respondents declared that they would not eat other meals than those that fall within the scope of the study. The daily value of the diet was 3541.90 kcal (14,819.66 kJ) (Table 2). One hour before the start of the test, all participants received a breakfast with energy 613 kcal (2565 kJ). The nutritional value of the meals was estimated using the dietary calculator Nutritionist 2012 (Software Jumar 2012), based on the nutritional value determined by Polish Institute Food and Nutrition.

Aerobic test

The aerobic test was performed at the beginning of the study after 3 days of diet which was the same for all of the participants. Then after 3 days of sugar supplementation. The study design is presented in Fig. 1. Maximal oxygen uptake (VO_{2max}) was determined using a cycle

Table 2 The nutritional and energy value of 3-day diet (without drinks)

Energy value (kcal)	3541.90
Carbohydrates (g)	589.9
Proteins (g)	156.3
Fat (g)	72.2
Fibre (g)	30.3



ergometry test on an electromagnetically braked cycle ergometer (ER 900 Jaeger, Germany/Viasys Health Care). Participants were allowed a 5-min warm-up period at an intensity of 1.5 W kg with a pedalling cadence of 60 rpm. Immediately after the warm-up, the participants began VO₂ max testing by cycling at increasingly difficult workloads, in which resistance was increased by 25 W min until the participant reached the point of volitional exhaustion. Breath-by-breath pulmonary gas exchange was measured (Oxycon-Pro, Jaeger-Viasys Health Care, Hochberg, Germany) throughout the VO₂ max test. The O₂ and CO₂ analysers were calibrated before each test using standard gases of known concentrations in accordance with the manufacturer's guidelines.

Blood analysis

A professional nurse collected blood samples. Samples were obtained from an antecubital vein into single-use containers with an anticoagulant (EDTA K2) before and 1 h after the aerobic test. The serum hepcidin levels were determined using a DRG ELISA kit CRP, IL6.

Results

Of the 21 subjects who were enrolled in the study, four were excluded because of failure to complete the second exercise test (Fig. 1). Therefore, only 17 subjects are included in the analyses. No difference was observed between fructose vs glucose supplementation in the dietary intake for total kilocalories, total grams of protein, or percentage protein. As discussed in the methods, they remained on the same diet for 3 days before the exercise test.

Effect of fructose and glucose supplementation on blood hepcidin

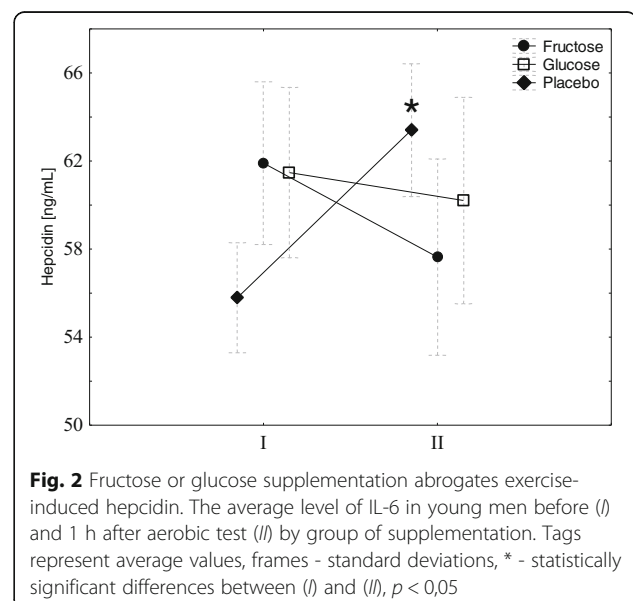
To evaluate the effect of fructose or glucose supplementation on iron metabolism, the subjects underwent an exercise test to exhaustion and the blood hepcidin was then measured. As shown in Fig. 2, exercise induced a significant increase in blood hepcidin in subjects who were on the diet without supplementation (placebo). Conversely, no changes in hepcidin concentration were observed in subjects whose diet was supplemented with fructose or glucose. Notably, 3 days of diet supplemented with fructose or glucose did not influence the resting blood hepcidin.

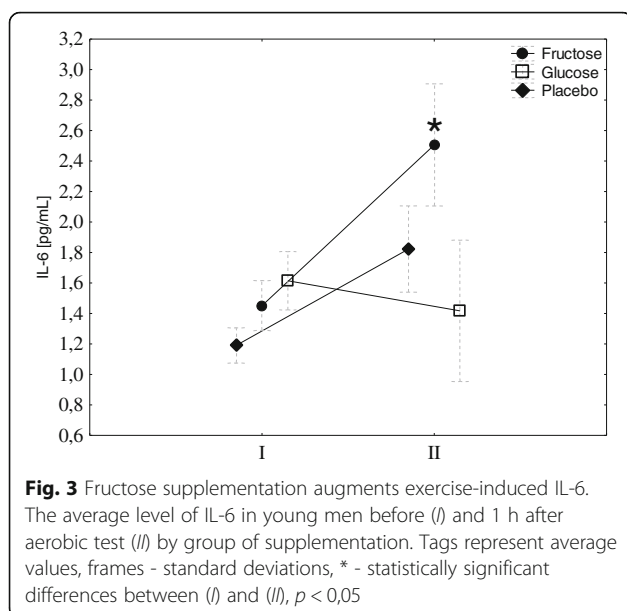
Hepcidin biosynthesis is stimulated by IL-6; therefore, its concentration was evaluated before and after exercise. Exercise induced a significant increase in IL-6 in the fructose group and had no effects in the G group. A small increase in IL-6 was observed in the placebo group; however, the changes were not significant (Fig. 3). Neither exercise nor diet had effect on blood CRP concentration (Fig. 4).

Discussion

In the present study, we demonstrated that a diet rich in simple sugars, fructose or glucose modulates iron metabolism in young men. Sugar can stimulate intestinal iron absorption; however, the mechanism of this has not been fully elucidated [16]. It is proposed that fructose increases dietary non-heme iron absorption, possibly by chelating and/or reducing iron into the ferrous form [17].

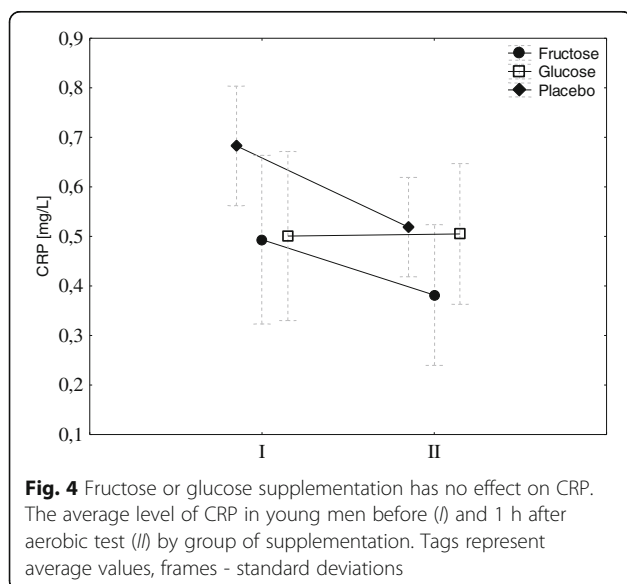
Many scientific papers state that iron deficiency is the most common nutrition deficit in the world. Conversely, in the Western world, iron overload is much more common than iron deficiency. For example, a study performed on elderly subjects demonstrated that 12.9% of the studied population were iron overloaded (serum





ferritin (SF) $>300 \mu\text{g/L}$ in men and $200 \mu\text{g/L}$ in women), whereas only 3% were iron deficient (SF $< 12 \mu\text{g/L}$) [18].

A study performed on young men demonstrated that most had blood ferritin concentrations above $150 \mu\text{g/L}$ and this was associated with low cardiovascular fitness [6]. The authors estimated that in the USA alone, approximately 24.8 M young men could have ferritin above this value. Notably, ferritin the reference value is 16 to $300 \mu\text{g/L}$; however, an increasing number of studies have demonstrated that persons with ferritin above $100 \mu\text{g/L}$ are at risk for several morbidities, including cancer diabetes, heart attack and others [19–21]. Therefore, it is important to determine the reason for excess iron accumulation in so many people. Certainly, diet and exercise are two important determinants



of iron status. Recently, we demonstrated that regular training reduced body iron stores in the elderly [10]. Moreover, highly trained young men are characterised by lower body iron stores compared to untrained young men [14]. Why regular training reduces body iron stores is not precisely understood; however, an increase in blood hepcidin may be an important cause. A single exercise session can lead to an increase in blood hepcidin, [14, 22] which can lead to lower intestinal iron absorption because it blocks ferroportin, a protein that exports iron from enterocytes into blood [15].

High sugar consumption is typical for highly developed countries. The average sugar consumption in the United States is approximately 70 kg per person per year [23]. A diet rich in sugar may increase physical performance by stimulating glycogen biosynthesis. This is one reason why many athletes consume sugar-rich diets. If super compensation of glycogen is to be achieved, the diet should contain approximately 70% carbohydrates. Unfortunately, often sweets or other products rich in sucrose or simple sugars are an essential part of the athlete diet. This is why this study diet was supplemented with fructose or glucose. Doses of 4 g/kg body weight per day were applied. Here, we present evidence that supplementation of the diet with fructose or glucose abrogates the increase in blood hepcidin after exercise. It was previously reported that not all subjects respond the same way; therefore, they were divided into responders and nonresponders, those whose blood hepcidin increased or did not change after exercise, respectively. The reasons for this are not known. Peeling and co-workers suggested that it is due to the difference in body iron stores, and persons with low iron stores do not respond to exercise by increasing hepcidin biosynthesis. Consistent with this, blood hepcidin did not change after 100 km in runners who were also characterized by relatively low ferritin levels ($53 \mu\text{g/L}$) [24]. The results of this study indicate that the difference could be a result of the diet.

Exercise stimulates IL-6 release from skeletal muscle and induces hepcidin biosynthesis in the liver [25]. We observed that exercise significantly increased the IL-6 concentration only in subjects whose diet was supplemented with fructose. If it is, consider that IL-6 is a skeletal muscle origin [26] these data suggest that fructose has some effect on muscle metabolism distinct than glucose. In addition it rather excludes the role of IL-6 in inducing an increase in hepcidin after exercise and are consistent our previous studies on ultra-marathoners in whom an increase in IL-6 was not accompanied by changes in blood hepcidin [24].

Conclusion

In conclusion, this study demonstrated that high consumption of fructose or glucose abrogates the exercise-induced increase in blood hepcidin. These data suggest that high sugar is a reason for excess body iron accumulation.

Abbreviations

BM: Body mass; LIP: Labile iron pool; ROS: Reactive oxygen species; SF: Serum ferritin; VO2: Max maximal oxygen uptake

Acknowledgements

We would like to express our thanks to whole team and all students for their engagement in the experiment.

Funding

The experiment was founded by knowledge grant of Polish Ministry of Science and Higher Education No 0016/R52/2013/52.

Availability of data and materials

Data are all contained within the article.

Authors' contributions

MT design and control the diet, participated in the hepcidin measurement, drafted the manuscript. JK participated in the design of the study and performed the statistical analysis. DF carried out the elisa measurements. WS participated in the design of the study and helped to draft the manuscript. RC participated in design and helped to draft the manuscript. JA participated in design and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Consent for publication

Consent to publish has been obtained from the participant to report individual patient data.

Ethics approval and consent to participate

The participants were fully informed and gave written informed consent to participate in this study as approved by the Medical Research Ethics Committee of the Medical University of Gdansk in Poland. Details that might disclose the identity of the subjects under study have been omitted.

Publisher's Note

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

Author details

¹Department of Biochemistry, Gdansk University of Physical Education and Sport, Kazimierza Gorskiego 1, 80-336 Gdansk, Poland. ²Department of Recreation and Quality Tourism, Gdansk University of Physical Education and Sport, Kazimierza Gorskiego 1, 80-336 Gdansk, Poland. ³Department of Bioenergetics and Physiology of Exercise, Medical University of Gdansk, Gdansk, Poland. ⁴Department of Physiotherapy, University of Physical Education and Sport, Kazimierza Gorskiego, Gdańsk, Poland.

Received: 21 October 2016 Accepted: 14 April 2017

Published online: 20 April 2017

References

- Alaunyte I, Stojceska V, Plunkett A, Derbyshire E. Dietary iron intervention using a staple food product for improvement of iron status in female runners. *J Int Soc Sports Nutr*. 2014;11:50.
- Kell DB. Iron behaving badly: inappropriate iron chelation as a major contributor to the aetiology of vascular and other progressive inflammatory and degenerative diseases. *BMC Med Genomics*. 2009;2:2.
- Punduk Z, Oral O, Ozkayin N, Rahman K, Varol R. Single dose of intra-muscular platelet rich plasma reverses the increase in plasma iron levels in exercise-induced muscle damage: a pilot study. *J Sport Health Sci*. 2016;5:109–14.
- Kruszewski M. Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress. *Mutat Res*. 2003;531:81–92.
- Howard CT, Mckakpo US, Quakyi IA, Bosompem KM, Addison EA, Sun K, Sullivan D, Semba RD. Relationship of hepcidin with parasitemia and anemia among patients with uncomplicated plasmodium falciparum malaria in Ghana. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;77:623–6.
- Mainous 3rd AG, Diaz VA. Relation of serum ferritin level to cardiovascular fitness among young men. *Am J Cardiol*. 2009;103:115–8.
- Lee DH, Liu DY, Jacobs Jr DR, Shin HR, Song K, Lee IK, Kim B, Hider RC. Common presence of non-transferrin-bound iron among patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2006;29:1090–5.
- Antosiewicz J, Ziolkowski W, Kaczor JJ, Herman-Antosiewicz A. Tumor necrosis factor-alpha-induced reactive oxygen species formation is mediated by jnk1-dependent ferritin degradation and elevation of labile iron pool. *Free Radic Biol Med*. 2007;43:265–70.
- Sullivan JL. Is stored iron safe? *J Lab Clin Med*. 2004;144:280–4.
- Kortas J, Prusik K, Flis D, Prusik K, Ziemann E, Leaver N, Antosiewicz J. Effect of Nordic walking training on iron metabolism in elderly women. *Clin Interv Aging*. 2015;10:1889–96.
- Lee IM, Shiroma EJ, Lobelo F, Puska P, Blair SN, Katzmarzyk PT, Lancet Physical Activity Series Working G. Effect of physical inactivity on major non-communicable diseases worldwide: an analysis of burden of disease and life expectancy. *Lancet*. 2012;380:219–29.
- Li L. The financial burden of physical inactivity. *J Sport Health Sci*. 2014;3:58–9.
- Lakka TA, Nyyssonen K, Salonen JT. Higher levels of conditioning leisure time physical activity are associated with reduced levels of stored iron in Finnish men. *Am J Epidemiol*. 1994;140:148–60.
- Antosiewicz J, Kaczor JJ, Kasprzowicz K, Laskowski R, Kujach S, Luszczek M, Radziminski L, Ziemann E. Repeated "all out" interval exercise causes an increase in serum hepcidin concentration in both trained and untrained men. *Cell Immunol*. 2013;283:12–7.
- Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, Ganz T, Kaplan J. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*. 2004;306:2090–3.
- Charley PJ, Sarkar B, Stitt CF, Saltman P. Chelation of iron by sugars. *Biochim Biophys Acta*. 1963;69:313–21.
- O'Dell BL. Fructose and mineral metabolism. *Am J Clin Nutr*. 1993;58:771S–8S.
- Fleming DJ, Tucker KL, Jacques PF, Dallal GE, Wilson PW, Wood RJ. Dietary factors associated with the risk of high iron stores in the elderly Framingham heart study cohort. *Am J Clin Nutr*. 2002;76:1375–84.
- Zacharski LR, Chow BK, Howes PS, Shamayeva G, Baron JA, Dalman RL, Malenka DJ, Ozaki CK, Lavori PW. Decreased cancer risk after iron reduction in patients with peripheral arterial disease: results from a randomized trial. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100:996–1002.
- Salonen JT, Nyyssonen K, Korpela H, Tuomilehto J, Seppanen R, Salonen R. High stored iron levels are associated with excess risk of myocardial infarction in eastern Finnish men. *Circulation*. 1992;86:803–11.
- Tuomainen TP, Nyyssonen K, Salonen R, Tervahauta A, Korpela H, Lakka T, Kaplan GA, Salonen JT. Body iron stores are associated with serum insulin and blood glucose concentrations. Population study in 1,013 eastern Finnish men. *Diabetes Care*. 1997;20:426–8.
- Peeling P, Sim M, Badenhorst CE, Dawson B, Govus AD, Abbiss CR, Swinkels DW, Trinder D. Iron status and the acute post-exercise hepcidin response in athletes. *Plos One*. 2014;9:e93002.
- Johnson RJ, Segal MS, Sautin Y, Nakagawa T, Feig DI, Kang DH, Gersch MS, Benner S, Sanchez-Lozada LG. Potential role of sugar (fructose) in the epidemic of hypertension, obesity and the metabolic syndrome, diabetes, kidney disease, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr*. 2007;86:899–906.
- Kasprzowicz K, Ziemann E, Ratkowski W, Laskowski R, Kaczor JJ, Dadci R, Antosiewicz J. Running a 100-km ultra-marathon induces an inflammatory response but does not raise the level of the plasma iron-regulatory protein hepcidin. *J Sports Med Phys Fitness*. 2013;53:533–7.
- Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK, Ganz T. IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest*. 2004;113:1271–6.
- Pedersen BK, Febbraio M. Muscle-derived interleukin-6—a possible link between skeletal muscle, adipose tissue, liver, and brain. *Brain Behav Immun*. 2005;19:371–6.



Article

Marathon Run-induced Changes in the Erythropoietin-Erythroferrone-Hepcidin Axis are Iron Dependent

Maja Tomczyk ¹, Jakub Kortas ² , Damian Flis ³ , Barbara Kaczorowska-Hac ⁴,
Agata Grzybewska ¹ , Andzelika Borkowska ⁵, Ewa Lewicka ⁶, Alicja Dabrowska-Kugacka ⁶
and Jędrzej Antosiewicz ^{5,*}

¹ Department of Bioenergetics and Nutrition, Faculty of Physical Education, Gdansk University of Physical Education and Sport, 80-336 Gdansk, Poland; maja.tomczyk@awf.gda.pl (M.T.); agata.p3@gmail.com (A.G.)

² Department of Recreation and Qualify Tourism, Faculty of Tourism and Recreation, Gdansk University of Physical Education and Sport, 80-336 Gdansk, Poland; jakub.kortas@awf.gda.pl

³ Department of Bioenergetics and Nutrition, Faculty of Rehabilitation and Kinesiology, Gdansk University of Physical Education and Sport, 80-336 Gdansk, Poland; damian.flis@awf.gda.pl

⁴ Department of Occupational Therapy, Faculty of Rehabilitation and Kinesiology, Gdansk University of Physical Education and Sport, 80-336 Gdansk, Poland; barbara.kaczorowska@awf.gda.pl

⁵ Department of Bioenergetics and Physiology of Exercise, Medical University of Gdansk, 80-210 Gdansk, Poland; andzelika.b@gumed.edu.pl

⁶ Department of Cardiology and Electrotherapy, Medical University of Gdansk, 80-210 Gdansk, Poland; elew@gumed.edu.pl (E.L.); alidab@gumed.edu.pl (A.D.-K.)

* Correspondence: jant@gumed.edu.pl; Tel.: +48-583-491-456

Received: 18 March 2020; Accepted: 14 April 2020; Published: 17 April 2020



Abstract: Alterations in iron metabolism after physical activity are manifested through the rise of blood hepcidin (Hpc) levels. However, in many athletes, no changes in Hpc levels are observed after exercise despite the presence of inflammation. The missing links could be erythropoietin (EPO) and erythroferrone (ERFE), which down-regulate Hpc biosynthesis. EPO, ERFE and Hpc biosynthesis is modified by serum iron through transferrin receptor 2. Consequently, we investigated whether marathon-induced changes in EPO, ERFE and Hpc levels are blood iron-dependent. Twenty-nine healthy male marathon runners were analyzed. Serum iron, ferritin, transferrin, EPO, ERFE and Hpc levels were assessed before, immediately after, and 9 ± 2 days after the marathon. The runners whose serum Hpc decreased after the marathon ($n = 15$), showed a significant increase in ERFE levels. In athletes whose serum iron levels were below $105 \mu\text{g/day}$ ($n = 15$), serum EPO ($p = 0.00$) and ERFE levels ($p = 0.00$) increased with no changes in Hpc concentration. However, in athletes with low serum iron, no changes in EPO levels were observed when serum ferritin exceeded 70 ng/mL ($n = 7$). Conversely, an increase in ERFE levels was observed in marathoners with low serum iron, independently of serum ferritin ($n = 7$). This indicates modulation of blood iron may affect exercise-induced changes in the EPO/ERFE/Hpc axis. Further study is needed to fully understand the physiological meaning of the interdependence between iron and the EPO/ERFE/Hpc axis.

Keywords: ferritin; body iron stores; HFE mutation; HMGB1

1. Introduction

Physical activity has been shown to alter systemic and cellular iron metabolism. The main effect of exercise on iron metabolism seems to be mediated by hepcidin (Hpc), a hormone which inhibits

duodenal iron absorption through its release from intracellular stores to the blood. Exercise-induced increases in Hpc concentrations have been reported [1,2]. In addition, according to some studies, many individuals experience excess body iron accumulation, which could be partially associated with lack of exercise [3]. Iron accumulation in many organs, including the liver, heart, skeletal muscles and the endocrine system, may lead to a series of health disorders [4–6]. Conversely, high levels of exercise are associated with low body iron stores [3]. Furthermore, regular training decreases body iron stores both in professional athletes and recreationally active elderly people [7–10]. The exact mechanism of how exercise reduces body iron stores remains unknown. One of the possible explanations is that exercise increases blood hepcidin levels, diminishing the intestinal iron absorption [11]. Furthermore, a possible factor that could predispose iron accumulation is hereditary hemochromatosis [12]. It is one of the most common human genetic disorders, estimated to affect 1 in 300 people in populations of Northern European origin [13]. The three most common mutations responsible for the development of hemochromatosis are found in the *HFE* gene located on Chromosome 6. Since the *HFE* protein mediates intracellular signaling pathways which result in increased Hpc biosynthesis, it is of interest to determine whether athletes who harbor mutations in the *HFE* gene would respond the same way to exercise as runners harboring the wild-type (WT) *HFE* gene. Moreover, another possible explanation for the exercise-induced reduction of the body iron stores is the increase in erythropoiesis. In this case, stored iron (in ferritin) is incorporated into hemoglobin. The process of erythropoiesis is controlled by a number of factors, such as erythropoietin (EPO) and erythroferrone (ERFE), a newly discovered hormone [14]. Their metabolic effects are strictly related to iron metabolism and EPO has been shown to stimulate ERFE, which, in turn, reduces Hpc biosynthesis [14]. On the cell level, EPO gene expression is under the control of hypoxia inducible factor 1 alpha (HIF1 α). Low oxygen tension or decreased kidney interstitial fibroblast iron can lead to HIF1 α activation and increase EPO synthesis. In addition, an interconnection between hormones of EPO/ERFE/Hpc and iron metabolism is underlined by action of transferrin receptor 2 (Tfr2) which appears to function as a sensor of circulating iron. Tfr2 regulates Epo sensitivity and, in an iron-replete state, it restricts Epo action [15]. Furthermore, hepatic Tfr2 promotes iron signaling to stimulate hepcidin synthesis and inhibit iron fluxes to the bloodstream [16]. These data clearly indicate that both blood iron and intracellular iron may influence the effects of exercise on the EPO/ERFE/Hpc signaling axis.

The purpose of the current study was to reexamine the outcomes of a marathon run on the serum EPO-ERFE-Hpc signaling axis. In addition, the effects of *HFE* mutation, inflammation, serum iron concentration and iron stores on this axis were evaluated.

2. Materials and Methods

2.1. Experimental Approach to the Problem

To assess the marathon-induced changes in iron metabolism, the blood was sampled three times: 1 month before the marathon after a 3-d rest (Pre samples); immediately after the marathon run (Post1 samples); and 39.9 ± 2 days after the competition (Post2 samples).

Fasting blood was collected at the Pre and Post2 time points, in the morning; at the Post1 time point, the blood was collected immediately after the runners reached the finish line. Blood samples for hormones measurement were collected from the antecubital vein into a disposable vacutainer. Immediately after collection, the samples were centrifuged at $2000 \times g$ at 4°C , for 10 min. The serum was transferred to new tubes and stored at -80°C prior to biochemical analysis.

2.2. Subjects

41 amateur marathon runners took part in the study, however, 29 participants completed all stages of the experiment (mean age 40 ± 8 years).

Average marathon time obtained by participants was 3 h, 44 min, and 35 s.

Subject's characteristic and weekly training volume is presented in Table 1.

Table 1. General characteristics of participants.

	Baseline (<i>n</i> = 29)
Age [years]	39.29 ± 8.58
Height [m]	1.79 ± 0.05
Body mass [kg]	79.76 ± 7.50
BMI [kg/m ²]	24.89 ± 2.13
Training [h/week]	6.39 ± 2.28
Training [km/week]	55.84 ± 19.77

Values are means ± SD; BMI–body mass index.

The study was officially approved by the Bioethical Committee of the Regional Medical Society in Gdansk (KB-24/16) and performed in compliance with the Declaration of Helsinki. Before commencing the marathon run and testing, the study was verbally described to the subjects. All runners provided a written informed consent to participate in the study. In addition, prior the study, the runners obtained a signed agreement from their physicians confirming the ability to participate in the marathon.

2.3. Biochemical Analysis

The blood was taken three times, at the Pre, Post1, and Post2 time points. Total iron-binding capacity (TIBC), the iron, ferritin and leukocytes levels were measured at Synevo Medical Laboratory (Gdansk, Poland). The serum Hpc, ERFE, and high-mobility group box 1 protein (HMGB1) levels were determined using the appropriate Cloud-Clone Corp kits (Katy, TX, USA).

Quantitative determinations of EPO in the serum were performed automatically using IMMULITE 2000 EPO, a solid-phase enzyme-labeled chemiluminescent immunometric assay (IMMULITE 2000, Siemens). Potential changes in the hematocrit value were taken into consideration in data presentation.

2.4. Analysis of the Hemochromatosis HFE Gene

For the analysis, human DNA was isolated using the High Pure Polymerase Chain Reaction (PCR) Template Preparation Kit (Roche) (Belmont, CA, USA). The *HFE* genotype was determined using LightMix Kit HFE H63D S65C C282Y (TibMolbiol) and LightCyclerFastStart DNA Master HybProbe (Roche) (Belmont, CA, USA). The former is an in vitro diagnostic test, which enables the detection and identification of clinically-relevant single-nucleotide polymorphism variants p.H63D, p.S65C, and p.C282Y of the *HFE* gene. Two fragments of the *HFE* gene were PCR-amplified simultaneously using specific oligonucleotide fragments. Fluorescently labeled probes were used to identify the PCR products.

The genotype was determined by performing a melting curve analysis. The 284-bp PCR fragment containing the c.845G>A (C282Y) polymorphism was analyzed using a LightCycler Red 640 fluorophore. The 163 bp PCR fragment containing the c.197C>G (H63D) or c.193A>T (S65C) polymorphism was analyzed using a Simple Probe 519 fluorophore. Real-time PCR was performed using Light Cyclers 2.0 (Roche) (Belmont, CA, USA).

2.5. Statistical Analyses

Statistical analysis was performed using Statistica 12.0 software (Statsoft, Tulsa, OK). All values are expressed as the mean ± standard deviation (SD). A Shapiro–Wilk test was used to assess the homogeneity of dispersion from the normal distribution. A Brown–Forsythe test was used to evaluate the homogeneity of variance. For homogenous results, an analysis of variance (ANOVA) for repeated measures and post-hoc Tukey’s test were performed to identify significantly different

results. For heterogeneous results, ANOVA Friedman's test and the right post-hoc test were applied. The significance level was set at $p < 0.05$.

3. Results

The mean levels of iron, ferritin and transferrin were within normal range in all athletes, except two who presented decreased serum iron and transferrin levels (Table 2). Analysis of the *HFE* gene revealed that 11 of 29 runners were heterozygotes for H63D mutation; 18 runners harbored the WT *HFE* gene. No differences were noted in some study parameters (iron, ferritin, Hpc and ERFE levels) of the runners harboring WT and H63D *HFE* gene before and after the marathon (data not shown). However, one week after the marathon run, a slight increase in ERFE levels was observed in the WTHFE gene group (0.17 ± 0.12 vs. 0.24 ± 0.15 , $p = 0.01$). The serum levels of Hpc, the main regulator of iron metabolism, were measured before and after the marathon. Interestingly, seven of the H63D mutation carriers demonstrated an increase in Hpc levels after the marathon, while four showed a decrease. Furthermore, an increase in the markers of inflammatory response and muscle damage (creatine kinase (CK), leukocytes, neutrophils, and pentraxin 3) was apparent. However, contrary to the expectations, the levels of HMGB1, a pro-inflammatory protein [17], did not increase after the marathon. Finally, transferrin, TIBC and EPO levels increased after the marathon run (Table 2), which may indicate a stress-adaptive response induced by intense running (23,24).

Table 2. The effects of marathon running on the inflammation and iron metabolism in young man.

	Pre (<i>n</i> = 29)	Post1 (<i>n</i> = 29)	Post2 (<i>n</i> = 29)
Fe [$\mu\text{g/dL}$]	113.57 $\pm$ 47.27	115.10 $\pm$ 31.67	114.34 $\pm$ 47.12
Ferritin [ng/mL]	84.79 $\pm$ 51.36	93.32 $\pm$ 61.90	80.22 $\pm$ 55.65
Transferrin [mg/dL]	277.21 $\pm$ 33.66	303.59 $\pm$ 39.75 ^a , $p = 0.01$	278.34 $\pm$ 29.16 ^b , $p = 0.02$
TIBC [$\mu\text{g/dL}$]	316.76 $\pm$ 41.92	345.38 $\pm$ 42.65 ^a , $p = 0.03$	302.36 $\pm$ 41.03 ^b , $p = 0.00$
ERFE [ng/mL]	0.27 $\pm$ 0.43	0.42 $\pm$ 0.43	0.30 $\pm$ 0.35
EPO [mU/mL]	9.60 $\pm$ 3.61	13.09 $\pm$ 8.37 ^a , $p = 0.03$	10.27 $\pm$ 4.99
Hpc [ng/mL]	1.12 $\pm$ 0.39	1.09 $\pm$ 0.36	0.92 $\pm$ 0.38
HMGB-1 [ng/mL]	21.92 $\pm$ 3.91	21.17 $\pm$ 5.63	19.74 $\pm$ 4.06 ^a , $p = 0.04$
Pentraxin3 [pg/mL]	250.28 $\pm$ 85.93	403.68 $\pm$ 258.45 ^a , $p = 0.00$	166.70 $\pm$ 70.49 ^b , $p = 0.00$
Leukocytes [G/L]	6.03 $\pm$ 1.14	16.82 $\pm$ 3.59 ^a , $p = 0.00$	6.05 $\pm$ 1.88 ^b , $p = 0.00$
Neutrophils [G/L]	3.27 $\pm$ 0.85	14.12 $\pm$ 3.18 ^a , $p = 0.00$	3.35 $\pm$ 1.57 ^b , $p = 0.00$
CK [U/L]	158.00 $\pm$ 76.26	411.14 $\pm$ 173.50 ^a , $p = 0.00$	225.81 $\pm$ 142.49 ^b , $p = 0.00$

Values are means ($\pm$ SD); Fe-serum iron; TIBC-total iron binding capacity; ERFE-erythroferrone; EPO-erythropoietin; Hpc-hepcidin; HMGB-1-high-mobility group box 1 protein; CK-creatine kinase. Measurements: Pre—before the run; Post 1—at the finish line; Post 2—after 9 $\pm$ 2 days after the run; ^a significant differences compared to the Pre measurement; ^b significant differences compared to the Post 1 measurement.

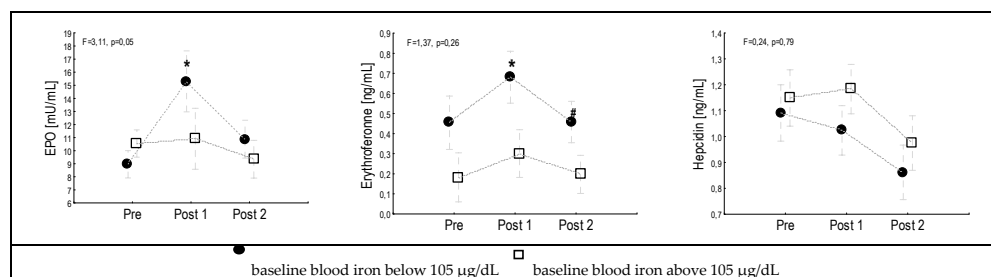
No statistically significant changes in Hpc levels were apparent at the Post1 and Post2 time points. However, detailed analysis revealed that Hpc levels increased in 14 runners (responders) and decreased in the remaining runners. A subsequent detailed analysis of several runner subgroups was performed to understand the triggering factors of the observed changes. The runners were divided into two groups: the Hpc-level increase group ($n = 14$) and the Hpc-level decrease group ($n = 15$). Detailed analysis of these groups revealed significant changes in the Hpc Post 1 levels (Table 3). Furthermore, after the marathon run, the ERFE levels were significantly elevated in runners whose Hpc levels decreased (Table 3). The levels returned to the baseline values in Post2 measurements. At the completion of the race, an increase in transferrin levels was observed in both groups. Furthermore, the Post2 serum iron levels decreased in the Hpc-level increase group (Table 3).

Table 3. Marathon run-induced changes in serum hepcidin (Hpc) levels are related to the increase in serum ERFE levels.

	Group	Pre	Post 1	Post 2
Fe [µg/dL]	ΔHpc↑ (n = 14)	113.64 ± 54.60	115.64 ± 30.58	98.29 ± 39.78
	ΔHpc↓ (n = 15)	113.50 ± 40.73	114.60 ± 33.71	129.33 ± 49.73
Ferritin [ng/mL]	ΔHpc↑ (n = 14)	80.51 ± 46.16	88.84 ± 60.31	76.87 ± 59.26
	ΔHpc↓ (n = 15)	88.79 ± 57.11	97.49 ± 65.17	83.35 ± 53.96
Transferrin [mg/dL]	ΔHpc↑ (n = 14)	280.50 ± 40.72	310.21 ± 46.60 ^{a, p = 0.00}	279.07 ± 28.49 ^{b, p = 0.00}
	ΔHpc↓ (n = 15)	274.13 ± 26.56	297.40 ± 32.53 ^{a, p = 0.00}	277.67 ± 30.74 ^{b, p = 0.00}
TIBC [µg/dL]	ΔHpc↑ (n = 14)	314.93 ± 47.53	352.07 ± 47.42 ^{a, p = 0.00}	304.00 ± 35.91 ^{b, p = 0.00}
	ΔHpc↓ (n = 15)	318.47 ± 37.56	339.13 ± 38.26	300.83 ± 46.53 ^{b, p = 0.00}
ERFE [ng/mL]	ΔHpc↑ (n = 14)	0.40 ± 0.60	0.45 ± 0.57	0.36 ± 0.48
	ΔHpc↓ (n = 15)	0.16 ± 0.13	0.40 ± 0.27 ^{a, p = 0.00}	0.24 ± 0.12 ^{b, p = 0.00}
EPO [mU/mL]	ΔHpc↑ (n = 14)	9.34 ± 2.85	14.24 ± 9.65	8.91 ± 2.86 ^{b, p = 0.00}
	ΔHpc↓ (n = 15)	9.85 ± 4.29	12.17 ± 7.42	11.53 ± 6.21
Hpc [ng/mL]	ΔHpc↑ (n = 14)	0.81 ± 0.23 †	1.09 ± 0.37 ^{a, p = 0.00}	0.77 ± 0.28 ^{b, p = 0.00}
	ΔHpc↓ (n = 15)	1.41 ± 0.28	1.09 ± 0.35 ^{a, p = 0.00}	1.06 ± 0.42 ^{a, p = 0.00}
HMGB-1 [ng/mL]	ΔHpc↑ (n = 14)	21.57 ± 3.51	20.67 ± 4.35	18.88 ± 4.35
	ΔHpc↓ (n = 15)	22.24 ± 4.34	21.64 ± 6.73	20.55 ± 3.74
Pentaxin3 [pg/mL]	ΔHpc↑ (n = 14)	266.24 ± 97.66	351.49 ± 238.99	171.72 ± 67.56
	ΔHpc↓ (n = 15)	235.46 ± 73.96	452.1 ± 274.99 ^{a, p = 0.00}	162.41 ± 75.17 ^{b, p = 0.00}
Leukocytes [G/L]	ΔHpc↑ (n = 14)	5.86 ± 1.15	16.42 ± 3.57 ^{a, p = 0.00}	6.10 ± 2.30 ^{b, p = 0.00}
	ΔHpc↓ (n = 15)	6.21 ± 1.15	17.22 ± 3.70 ^{a, p = 0.00}	6.00 ± 1.43 ^{b, p = 0.00}
Neutrophils [G/L]	ΔHpc↑ (n = 14)	3.14 ± 0.73	13.75 ± 3.02 ^{a, p = 0.00}	3.47 ± 2.00 ^{b, p = 0.00}
	ΔHpc↓ (n = 15)	3.41 ± 0.96	14.48 ± 3.40 ^{a, p = 0.00}	3.22 ± 1.04 ^{b, p = 0.00}
CK [U/L]	ΔHpc↑ (n = 14)	144.92 ± 63.51	445.86 ± 193.25 ^{a, p = 0.00}	206.77 ± 121.52 ^{b, p = 0.00}
	ΔHpc↓ (n = 15)	165.79 ± 87.34	376.43 ± 150.26 ^{a, p = 0.00}	243.50 ± 162.10 ^{b, p = 0.00}

Values are means (± SD); Fe-serum iron; TIBC-total iron binding capacity; ERFE-erythroferrone; EPO-erythropoietin; Hpc-hepcidin; HMGB1-high-mobility group box 1 protein; CK-creatin kinase. Measurements Pre—before the run; Post1—at the finish line; Post2—9 ± 2 days after the run; ^a significantly different from the Pre measurement; ^b significantly different from the Post1 measurement; † significant differences between groups.

To evaluate the effect of the serum iron levels on marathon-induced changes in EPO, ERFE and Hpc levels, the runners were divided into two groups, based on serum iron concentrations, at which significant changes in the EPO, ERFE and Hpc parameters were observed. In the first group (n = 15), the serum iron pre-concentration was < 105 µg/dL (81 ± 21 µg/dL), while in the second group (n = 14), it was >105 µg/dL (146 ± 43 µg/dL). Interestingly, a significant increase in serum EPO and ERFE levels, and a slight reduction in Hpc levels were observed in the runners whose serum iron pre levels were below 105 µg/dL (Figure 1).

**Figure 1.** Blood iron levels determine the effect of marathon running on hormones involved in the iron metabolism. Legend: Pre—before the run, Post1—at the finish line, Post 2—9 ± 2 days after the run; * significantly different from the Pre measurement, # significantly different from the Post 1 measurement.

To assess the relationship between body iron stores (represented by serum ferritin), and EPO, ERFE and Hpc, the runners were divided into two groups: those with ferritin levels < 70 ng/mL

(39 ± 21 ng/mL, $n = 13$) and those with levels > 70 ng/mL (122 ± 35 ng/mL, $n = 16$). EPO levels increased in the former group (Pre: 10.75 ± 4.59 mU/mL; Post1: 17.28 ± 11.61 mU/mL) but remained unchanged in the latter group (Pre: 8.7 ± 2.34 ; Post1: 10.4 ± 3.38). Furthermore, the EPO levels did not change in the runners with ferritin levels exceeding 70 ng/mL ($n = 7$), even when they were accompanied by serum iron levels below 105 μ g/dL. Furthermore, a significant negative correlation was apparent between the baseline ferritin and EPO levels at the three time points analyzed (Pre: $r = -0.48$, $p = 0.03$; Post1: $r = 0.53$; $p = 0.01$; Post2: $r = 0.50$, $p = 0.02$). The serum iron levels were also negatively correlated with EPO levels after the marathon run (Post1: $r = 0.50$, $p = 0.02$; Post2, $r = 0.40$, $p = 0.05$). Conversely, ERFE levels increased only in athletes with serum iron levels below 105 μ g/dL ($n = 15$), and the ferritin status did not affect the response to the marathon run (data not shown).

4. Discussion

In the present study, we demonstrated that alterations in the levels of hormones regulating the iron metabolism (EPO, ERFE, and Hpc) induced by a marathon run significantly depend on the serum iron and ferritin concentrations at the baseline. However, changes in the iron metabolism of athletes who are *HFE* H63D heterozygotes were similar to those in athletes who harbor the WT *HFE* gene. Hence, the initial hypothesis that Hpc levels in the former are different from the latter was not confirmed. Interestingly, most of the obtained results indicated that exercise increases serum Hpc levels. However, Hpc levels do not change after exercise in some athletes [18–20]. The underlying mechanism of this phenomenon remains unresolved. Since *HFE* mutations are common among the Caucasian population [13], we hypothesized that the Hpc response to exercise might be impaired in athletes who are *HFE* heterozygotes. In the current study, increased Hpc levels after the marathon run were noted for 14 runners, while Hpc levels decreased in 15 runners. *HFE* heterozygotes were identified in both groups. Hence, the data did not support the initial hypothesis.

In the current study, the only difference between the WT *HFE* gene and H63D gene carriers was a decrease in Hpc levels in the former one week after the marathon. It has been previously reported that the iron stores in young boys and girls who do not engage in a regular physical activity and harbor the H63D mutation are higher than in WT controls [21]. In the current study, we did not observe a statistically significant difference in the serum ferritin levels among groups. Previously, it has been shown that regular exercise results in a reduction of body iron stores [12,13], which could explain observations reported herein. It was also suggested that low serum ferritin levels are associated with the absence of Hpc response to exercise. In athletes, whose ferritin levels were below 30 ng/mL, no changes in Hpc concentration after exercise are noted [19]. In the current study, only four participants had ferritin levels below 30 ng/mL. An increase of Hpc levels upon exercise was noted in two of them. In addition, no correlation was apparent between serum ferritin and Hpc levels before and after the marathon run. Hpc is a hormone that inhibits iron absorption from the digestive tract and iron release from the intracellular stores [22]. Stimulated erythropoiesis results in increased iron demand which leads to Hpc down-regulation. The mechanism of Hpc down-regulation has been clarified recently by the discovery of a new hormone, ERFE, which inhibits hepatic Hpc biosynthesis [14]. Although it is generally known that regular exercise stimulates erythropoiesis, and the erythrocyte mass of the athletes is higher than in inactive individuals, to the best of our knowledge, no data explaining the effect of exercise on the blood ERFE levels in humans have been published. Data presented in the current study demonstrate that ERFE levels increase after the marathon run and remain elevated nine days later, but only in the runners whose Hpc levels decreased after the marathon run. This may suggest an inhibitory effect of ERFE on hepcidin biosynthesis [14]. In addition, the findings of the current study indicate that a reduction or, possibly, no changes in the Hpc levels after a race could be explained by increased ERFE levels. On the other hand, an increase in Hpc levels after the race cannot be explained by changes in ERFE levels, but, rather, by increased levels of pro-inflammatory cytokines [23]. Considering that extreme exercises, such as marathon running, stimulates pro-inflammatory cytokines production, it is possible that the iron metabolism is affected in some cells exposed to high cytokine

levels [24,25]. The observed increase in pentraxin 3 and the number of leukocytes, confirmed that the marathon induced significant inflammation. Furthermore, detailed analysis revealed that athletes with low serum iron levels ($<105 \mu\text{g/dL}$) presented a significant increase in ERFE levels after the marathon, while ERFE levels were stable in those with high serum iron levels ($>105 \mu\text{g/dL}$). Interestingly, serum ferritin concentration, considered to be a good marker of the body iron stores [26], had no effect on the marathon-induced changes in ERFE levels.

EPO stimulates ERFE biosynthesis [14]. Hence, we anticipated that the iron status could influence ERFE synthesis via its effects on EPO concentration. The reported effect of a marathon run on serum EPO levels is unclear: it either increases, decreases or does not change after the run [27,28]. The mechanism of this phenomenon is also unknown. Data presented in the current study clearly indicate that the marathon-induced increase in EPO levels is determined by the serum iron levels and body iron stores. EPO levels increased in the runners with a low baseline concentration of serum iron and ferritin. In animal models, serum iron in the form of diferric transferrin triggers signaling through a transferrin receptor 2 (Tfr2). Tfr2 is expressed in the liver and erythroid cells. Blocking this receptor leads to increased EPO and ERFE production, and decreased Hpc biosynthesis [29]. It can be expected that, during a marathon run, the hypoxic signaling is augmented in runners with low serum iron levels and reduced in athletes with high serum iron levels. Indeed, increased EPO and ERFE levels were observed only in the runners with low blood iron levels. This is supported by the observation that exposure of iron-deficient patients to hypoxia increases serum EPO levels to a greater extent than in individuals with normal iron status [30]. Conversely, hypoxia-induced changes in Hpc levels are minute in iron-deficient patients [30]. In addition, iron can influence Hpc synthesis by triggering signaling which inhibits EPO synthesis. The summary of the potential effects of a marathon run on cellular iron metabolism is presented in Figure 2.

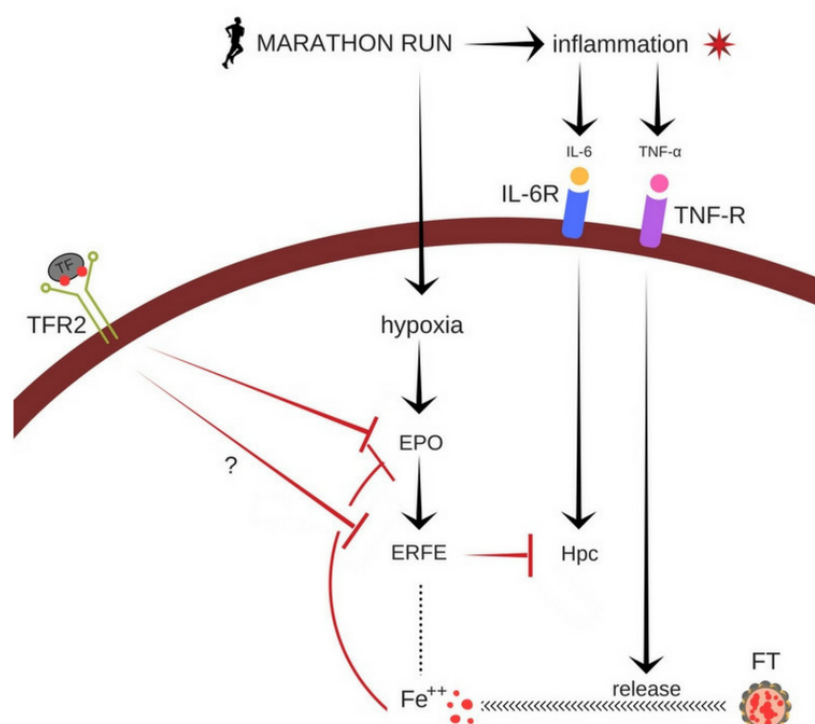


Figure 2. Summary of the potential effects of a marathon running on cellular iron metabolism.

The figure shows the complexity of cellular iron metabolism. Extreme exercise, such as marathon running, induces inflammation, which can be measured, e.g., by the increase of the interleukin 6 (IL-6) levels in the blood which may lead to an increase in Hpc biosynthesis in the cell. By contrast, marathon run-induced hypoxia stimulates EPO and ERFE biosynthesis, which can inhibit of Hpc biosynthesis.

Diferic transferrin binding to Tfr2, triggers signaling that leads to the inhibition of EPO and ERFE synthesis. This signaling is abrogated in athletes with relatively low blood iron levels. Exercise-induced inflammation can trigger ferritin degradation and iron release, which can inhibit EPO biosynthesis.

→ - *stimulation*; -| - *suppression*; - *unknown effect*; ? - *possible effect*

Author Contributions: Conceptualization, M.T. and J.A.; methodology, E.L. and A.D.-K.; validation, J.K. and A.B.; investigation, D.F. and M.T.; resources, J.A.; data curation, M.T.; writing, original draft preparation, M.T. and J.A.; supervision J.A.; writing, review and editing, M.T., J.K., D.F., B.K.-H., A.G., A.B., E.L., A.D.-K. and J.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The study was funded by Knowledge Grant of Polish Ministry of Science and Higher Education (number NRSA 406754).

Acknowledgments: We would like to thank the runners for participating in the study.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The results of this study are presented clearly, honestly, and without fabrication, falsification, or inappropriate data manipulation.

Abbreviations

Hpc: hepcidin; ERFE: erythroferrone; EPO: erythropoietin; TrR2: transferrin receptor 2; HFE: homeostatic iron regulator; high Fe; WT: wild type; TIBC: total iron body capacity; HMGB1: high mobility group box 1; PCR: polymerase chain reaction; CK: creatine kinase; Fe: serum iron level; IL-6: interleukin 6.

References

- Antosiewicz, J.; Kaczor, J.J.; Kaspruwicz, K.; Laskowski, R.; Kujach, S.; Luszczyk, M.; Radziminski, L.; Ziemann, E. Repeated “all out” interval exercise causes an increase in serum hepcidin concentration in both trained and untrained men. *Cell. Immunol.* **2013**, *283*, 12–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Antosiewicz, J.; Ziolkowski, W.; Kaczor, J.J.; Herman-Antosiewicz, A. Tumor necrosis factor- α -induced reactive oxygen species formation is mediated by JNK1-dependent ferritin degradation and elevation of labile iron pool. *Free. Radic. Boil. Med.* **2007**, *43*, 265–270. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Balaban, E.P.; Snell, P.; Stray-Gundersen, J.; Frenkel, E.P. The effect of running on serum and red cell ferritin. A longitudinal comparison. *Int. J. Sports Med.* **1995**, *16*, 278–282. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Borkowska, A.; Sielicka-Dudzin, A.; Herman-Antosiewicz, A.; Halon, M.; Wozniak, M.; Antosiewicz, J. P66Shc mediated ferritin degradation—a novel mechanism of ROS formation. *Free. Radic. Boil. Med.* **2011**, *51*, 658–663. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Candau, R.; Busso, T.; Lacour, J.R. Effects of training on iron status in cross-country skiers. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **1992**, *64*, 497–502. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Frise, M.C.; Cheng, H.-Y.; Nickol, A.H.; Curtis, M.K.; Pollard, K.A.; Roberts, D.J.; Ratcliffe, P.J.; Dorrington, K.L.; Robbins, P.A. Clinical iron deficiency disturbs normal human responses to hypoxia. *J. Clin. Investig.* **2016**, *126*, 2139–2150. [[CrossRef](#)]
- Ganz, T.; Nemeth, E. Iron imports. IV. Hepcidin and regulation of body iron metabolism. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* **2006**, *290*, G199–G203. [[CrossRef](#)]
- Halon-Golabek, M.; Borkowska, A.; Kaczor, J.J.; Ziolkowski, W.; Flis, D.; Knap, N.; Kasperuk, K.; Antosiewicz, J. hmSOD1 gene mutation-induced disturbance in iron metabolism is mediated by impairment of Akt signalling pathway. *J. Cachex- Sarcopenia Muscle* **2018**, *9*, 557–569. [[CrossRef](#)]
- Jacobs, A.; Worwood, M. Ferritin in serum. Clinical and biochemical implications. *N. Engl. J. Med.* **1975**, *292*, 951–956. [[CrossRef](#)]
- Kaczorowska-Hac, B.; Luszczyk, M.; Antosiewicz, J.; Ziolkowski, W.; Adamkiewicz-Drozynska, E.; Mysliwiec, M.; Milosz, E.; Kaczor, J.J. HFE Gene Mutations and Iron Status in 100 Healthy Polish Children. *J. Pediatr. Hematol.* **2017**, *39*, e240–e243. [[CrossRef](#)]
- Kaspruwicz, K.; Ziemann, E.; Ratkowski, W.; Laskowski, R.; Kaczor, J.J.; Dadci, R.; Antosiewicz, J. Running a 100-km ultra-marathon induces an inflammatory response but does not raise the level of the plasma iron-regulatory protein hepcidin. *J. Sports Med. Phys. Fit.* **2013**, *53*, 533–537.

12. Kautz, L.; Jung, G.; Valore, E.V.; Rivella, S.; Nemeth, E.; Ganz, T. Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism. *Nat. Genet.* **2014**, *46*, 678–684. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Klausen, T.; Breum, L.; Fogh-Andersen, N.; Bennett, P.; Hippe, E. The effect of short and long duration exercise on serum erythropoietin concentrations. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **1993**, *67*, 213–217. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Kortas, J.; Kuchta, A.; Prusik, K.; Prusik, K.; Ziemann, E.; Labudda, S.; Ćwiklińska, A.; Wieczorek, E.; Jankowski, M.; Antosiewicz, J. Nordic walking training attenuation of oxidative stress in association with a drop in body iron stores in elderly women. *Biogerontology* **2017**, *18*, 517–524. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Antosiewicz, J.; Kortas, J.; Prusik, K.; Flis, D.; Leaver, N.; Ziemann, E.; Prusik, K. Effect of Nordic Walking training on iron metabolism in elderly women. *Clin. Interv. Aging* **2015**, *10*, 1889–1896. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Lakka, T.A.; Nyssönen, K.; Salonen, J. Higher Levels of Conditioning Leisure Time Physical Activity are Associated with Reduced Levels of Stored iron in Finnish Men. *Am. J. Epidemiol.* **1994**, *140*, 148–160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Luo, Y.; Yoneda, J.; Ohmori, H.; Sasaki, T.; Kuniyasu, H. Abstract 3380: Cancer usurps skeletal muscle as an energy repository. *Mol. Cell. Biol.* **2014**, *74*, 3380.
18. Nai, A.; Lidonnici, M.R.; Rausa, M.; Mandelli, G.; Pagani, A.; Silvestri, L.; Ferrari, G.; Camaschella, C. The second transferrin receptor regulates red blood cell production in mice. *Blood* **2015**, *125*, 1170–1179. [[CrossRef](#)]
19. Nai, A.; Pellegrino, R.M.; Rausa, M.; Pagani, A.; Boero, M.; Silvestri, L.; Saglio, G.; Roetto, A.; Camaschella, C. The erythroid function of transferrin receptor 2 revealed by Tmprss6 inactivation in different models of transferrin receptor 2 knockout mice. *Haematology* **2014**, *99*, 1016–1021. [[CrossRef](#)]
20. Nemeth, E.; Roetto, A.; Garozzo, G.; Ganz, T.; Camaschella, C. Hepcidin is decreased in TFR2 hemochromatosis. *Blood* **2005**, *105*, 1803–1806. [[CrossRef](#)]
21. Nemeth, E.; Tuttle, M.; Powelson, J.; Vaughn, M.B.; Donovan, A.; Ward, D.M.; Ganz, T.; Kaplan, J. Hepcidin Regulates Cellular Iron Efflux by Binding to Ferroportin and Inducing Its Internalization. *Science* **2004**, *306*, 2090–2093. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Peeling, P. Exercise as a mediator of hepcidin activity in athletes. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **2010**, *110*, 877–883. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Peeling, P.; Sim, M.; Badenhorst, C.; Dawson, B.; Govus, A.; Abbiss, C.; Swinkels, R.W.; Trinder, D. Iron Status and the Acute Post-Exercise Hepcidin Response in Athletes. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e93002. [[CrossRef](#)]
24. Roecker, L.; Meier-Buttermilch, R.; Brechtel, L.; Nemeth, E.; Ganz, T. Iron-regulatory protein hepcidin is increased in female athletes after a marathon. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **2005**, *95*, 569–571. [[CrossRef](#)]
25. Schwandt, H.-J.; Heyduck, B.; Gunga, H.-C. Influence of prolonged physical exercise on the erythropoietin concentration in blood. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **1991**, *63*, 463–466. [[CrossRef](#)]
26. Sullivan, J.L. Is stored iron safe? *J. Lab. Clin. Med.* **2004**, *144*, 280–284. [[CrossRef](#)]
27. Falzacappa, M.V.V.; Spasić, M.V.; Kessler, R.; Stolte, J.; Hentze, M.W.; Muckenthaler, M.U. STAT3 mediates hepatic hepcidin expression and its inflammatory stimulation. *Blood* **2006**, *109*, 353–358. [[CrossRef](#)]
28. Worwood, M. Haemochromatosis. *Int. J. Lab. Hematol.* **1998**, *20*, 65–75. [[CrossRef](#)]
29. Zacharski, L.R.; Chow, B.K.; Howes, P.S.; Shamayeva, G.; Baron, J.A.; Dalman, R.L.; Malenka, D.J.; Ozaki, C.K.; Lavori, P.W. Decreased Cancer Risk after Iron Reduction in Patients with Peripheral Arterial Disease: Results From a Randomized Trial. *J. Natl. Cancer Inst.* **2008**, *100*, 996–1002. [[CrossRef](#)]
30. Zaloumis, S.; Allen, K.J.; Bertalli, N.A.; Turkovic, L.; Delatycki, M.B.; Nicoll, A.J.; McLaren, C.E.; English, D.R.; Hopper, J.; Giles, G.G.; et al. Natural history of HFE simple heterozygosity for C282Y and H63D: A prospective 12-year study. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2015**, *30*, 719–725. [[CrossRef](#)]

