



## **Uniwersytet Medyczny w Białymstoku**

DZIEDZINA NAUKI MEDYCZNE I NAUKI O ZDROWIU

DYSCYPLINA NAUKI MEDYCZNE

### **ROZPRAWA DOKTORSKA**

**Wpływ hipoksji normobarycznej na powysiłkowe zmiany  
metabolizmu sfingozyno-1-fosforanu we krwi kolarzy**

**Autor: Katarzyna Hodun**

Promotor: prof. dr hab. Marcin Baranowski

Zakład Fizjologii UMB

Kierownik jednostki: prof. dr hab. Adrian Chabowski

Rozprawa doktorska została zrealizowana w ramach kształcenia w Szkole Doktorskiej UMB

Białystok 2023



## **Medical University of Białystok**

FIELD OF MEDICAL AND HEALTH SCIENCES

SCIENTIFIC DISCIPLINE MEDICAL SCIENCES

### **DOCTORAL THESIS**

**The influence of normobaric hypoxia on exercise-induced changes  
in blood sphingosine-1-phosphate metabolism in cyclists**

**Author: Katarzyna Hodun**

First supervisor: prof. dr hab. Marcin Baranowski

Department of Physiology

Head of department: prof. dr hab. Adrian Chabowski

The doctoral thesis was carried out as a part of education at the Doctoral School of MUB

Białystok, 2023

### ***Podziękowania***

*Składam serdeczne podziękowania Promotorowi  
mojej pracy  
prof. dr hab. Marcinowi Baranowskiemu  
za nieocenioną pomoc, wsparcie merytoryczne  
w procesie przygotowania niniejszej rozprawy, zaangażowanie, poświęcony czas  
i okazaną wyrozumiałość*

*Serdecznie dziękuję Kierownikowi  
Zakładu Fizjologii  
prof. dr hab. Adrianowi Chabowskiemu  
za możliwość rozwoju naukowego oraz okazaną życzliwość*

*Pragnę podziękować Moim Rodzicom oraz Najbliższym za wiarę w moje  
możliwość, wielkie wsparcie i nieustanną motywację w dążeniu do celu.*

Niniejsza rozprawa doktorska została sfinansowana przez Narodowe Centrum  
Nauki w ramach grantu OPUS 16 o numerze 2018/31/B/NZ7/02543

## Spis treści

Życiorys.....	7
Zestawienie publikacji.....	12
Rozprawa doktorska.....	13
1. Artykuły stanowiące cykl prac włączonych do rozprawy doktorskiej.....	13
2. Wykaz stosowanych skrótów i oznaczeń.....	14
3. Wstęp.....	15
3.1. Wysiłek fizyczny w warunkach hipoksji.....	15
3.2. Metabolizm i transport sfingozyno-1-foforanu.....	16
3.3. Rola sfingozyno1-fosforanu w funkcjonowaniu mięśni szkieletowych i adaptacji do wysiłku fizycznego.....	17
3.4. Wpływ hipoksji na metabolizm sfingozyno-1-fosforanu.....	19
4. Cele pracy.....	20
5. Materiały i metody.....	21
5.1. Charakterystyka badanych.....	21
5.2. Przebieg eksperymentu.....	21
5.3. Frakcjonowanie krwi.....	22
5.4. Tempo uwalniania S1P i dhS1P.....	23
5.5. Izolacja lipoprotein osocza.....	23
5.6. Oznaczenie zawartości sfingolipidów metodą UPLC.....	24
5.7. Oznaczenie zawartości sfingolipidów metodą GLC.....	25
5.8. Oznaczenie białka.....	25
5.9. Oznaczenie stężenia hemoglobiny.....	26
5.10. Statystyka.....	26
6. Wyniki.....	27
6.1. Wysiłek o wzrastającym obciążeniu.....	27
6.2. Symulowana 30km kolarska próba czasowa.....	27
7. Wnioski.....	28
8. Publikacja nr 1.....	29

9.	Publikacja nr 2.....	41
10.	Streszczenie w języku polskim.....	51
11.	Streszczenie w języku angielskim .....	54
12.	Oświadczenia współautorów .....	56
13.	Uchwała komisji etycznej.....	67
14.	Bibliografia .....	69

# Życiorys

## Dane osobowe

---

Imię i Nazwisko: Katarzyna Hodun

Data i miejsce urodzenia: 03.04.1995, Mońki

## Wykształcenie

---

**2019–2023** Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim, Szkoła Doktorska, Zakład Fizjologii

**2022** Prawo Wykonywania Zawodu Diagnosty Laboratoryjnego

**2014–2019** Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Analityka Medyczna, studia jednolite magisterskie, stacjonarne

**2014–2019** III Liceum Ogólnokształcące im. Krzysztofa Kamila Baczyńskiego w Białymstoku

## Doświadczenie zawodowe

---

**2022–obecnie** Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim, Zakład Fizjologii, Asystent badawczo-dydaktyczny

## Publikacje naukowe

---

1. **Hodun K.**, Czuba M., Płoszczyca K., Sadowski J., Langfort J., Chabowski A., Baranowski M: The effect of normobaric hypoxia on acute exercise-induced changes in blood sphingoid base-1-phosphates metabolism in cyclists. *Biology of Sport*, 2023. **MEiN: 140. Impact factor: 5.6**

2. Sztolsztener K., Bzdęga W., **Hodun K.**, Chabowski A.: N-acetylcysteine decreases myocardial content of inflammatory mediators preventing the development of inflammation state and oxidative stress in rats subjected to a high-fat diet. *International Journal of Inflammation*, 2023. **MEiN: 140. Impact Factor: 2.0.**

---

3. Maciejczyk M., Zalewska A., Gryciuk M., **Hodun K.**, Czuba M., Płoszczyca K., Charmas M., Sadowski J., Baranowski M.: Effect of normobaric hypoxia on alterations in redox homeostasis, nitrosative stress, inflammation, and lysosomal function following acute physical exercise. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022. **MEiN: 100.**

4. Sztolsztener K., **Hodun K.**, Chabowski A.:  $\alpha$ -lipoic acid ameliorates inflammation state and oxidative stress by reducing the content of bioactive lipid derivatives in the left ventricle of rats fed a high-fat diet. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Basis of Disease*, 2022. **MEiN: 140. Impact Factor: 6.2.**

5. Motyka J., **Hodun K.**, Ławicki S.: Przydatność MMP-9 oraz TIMP-1 i TIMP-2 w diagnostyce raka piersi. *Wybrane zagadnienia z zakresu onkologii i zdrowia człowieka, Tygiel*, 2022. **MEiN: 20.**

6. Sztolsztener K., Żywno H., **Hodun K.**, Konończuk K., Myszyńska-Roslan K., Latoch E.: Apolipoproteins-New Biomarkers of Overweight and Obesity among Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Survivors? *International Journal of Molecular Sciences*, 2022. **MEiN: 140. Impact Factor: 5.6.**

7. **Hodun K.**, Chabowski A., Baranowski M.: Sphingosine-1-phosphate in acute exercise and training. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 2021. **MEiN: 140. Impact Factor: 4.645.**

8. **Hodun K.**, Sztolsztener K., Chabowski A.: Antioxidants supplementation reduces ceramide synthesis improving the cardiac insulin transduction pathway in a rodent model of obesity. *Nutrients*, 2021. **MEiN: 140. Impact Factor: 6.706.**

## **Konferencje naukowe**

---

1. **Hodun K.**, Płoszczyca K., Czuba M., Chabowski A., Sztolsztener K., Baranowski M.: „Effect of simulated 30km time trial under normobaric hypoxia on blood sphingoid base-1-phosphates metabolism in cyclists”. *The 62<sup>nd</sup> International Conference on the Bioscience of Lipids*, Montreal, Kanada, 2022.



- 
2. Sztolsztener K., **Hodun K.**, Chabowski A., Konstantynowicz-Nowicka K.: „The effect of cannabigerol on the expression of proteins involved in extracellular matrix formation in primary rat hepatocytes exposed to palmitate and fructose conditions”. *The 32<sup>nd</sup> Annual International Cannabinoid Research Society Symposium on the Cannabinoids*, Galway, Ireland, 2022.
  3. **Hodun K.**, Baranowski M.: Hipoksja hamuje wzrost stężenia sfingozyno-1-fosforanu w osoczu indukowany wysiłkiem. *XIII Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa Tygiel, "Interdyscyplinarność kluczem do rozwoju."* Lublin, Polska, 2021.
  4. Motyka J., **Hodun K.**, Ławicki S.: Rola chemokiny CXCL8 w raku piersi. *XIII Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa Tygiel, "Interdyscyplinarność kluczem do rozwoju."* Lublin, Polska, 2021.
  5. **Hodun K.**, Sztolsztener K., Konstantynowicz-Nowicka K., Bielawiec P., Chabowski A.: The effect of alfa lipoic acid on cardiac sphingolipid metabolism in rats on a high-fat diet regime. *4<sup>th</sup> Central European Biomedical Congress*, Kraków, Polska, 2021.
  6. Bielawiec P., Sztolsztener K., Konstantynowicz-Nowicka K., **Hodun K.**, Chabowski A., Harasim-Symbor E.: Impact of two-week cannabidiol administration on the n-6/n-3 PUFA ratio in the white skeletal muscle in a rat model of high fat diet-induced obesity. *4<sup>th</sup> Central European Biomedical Congress*, Kraków, Polska, 2021.
  7. Sztolsztener K., **Hodun K.**, Konstantynowicz-Nowicka K., Bielawiec P., Chabowski A.: Beneficial effect of n-acetylcysteine on sphingolipid metabolism in the left ventricle of obese rats. *4<sup>th</sup> Central European Biomedical Congress*, Kraków, Polska, 2021.
  8. Motyka J., **Hodun K.**, Ławicki S.: Ocena stężeń i przydatności diagnostycznej MMP-2, MMP-9, TIMP-1 i TIMP-2 w raku piersi. *XII Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa Tygiel, "Interdyscyplinarność kluczem do rozwoju."* Lublin, Polska, 2020.

## **Projekty naukowe**

---

**2018/31/B/NZ7/02543** Wykonawca projektu badawczego pt.: „Czy sfingozyno-1-fosforan jest jednym z czynników odpowiedzialnych za skuteczność treningu hipoksycznego?“, OPUS 16, Narodowe Centrum Nauki.

**SUB/1/DN/20/006/1118** Kierownik projektu pt.: „Wpływ długotrwałej cukrzycy streptozotocynowej oraz inhibitorów enzymów odpowiedzialnych za syntezę i rozkład ceramidu na zawartość sfingolipidów w korze przedczołowej. Projekt statutowy Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

**SUB/1/DN/22/012/1118** Kierownik projektu pt.: „Wpływ Saponiny D na składniki macierzy zewnątrzkomórkowej w ludzkich fibroblastach skórnych w procesie starzenia.” Projekt statutowy Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

## **Wyjazdy na staże i praktyki**

---

**01.09.2022-30.11.2022** – staż w ramach programu „Inicjatywa doskonałości – uczelnia badawcza” (IDUB11), University of Guelph, College of Biological Science, Department of Human Health and Nutritional Sciences, David Mutch Lab, Guelph, Ontario, Kanada

**01.08.2018-30.09.2018** – praktyki w ramach programu Erasmus w Hospital General Universitario de Valencia, Servicio de Análisis Clínicos, Goitzane Marcaida Benito Lab, Walencja, Hiszpania

## **Szkolenia i kursy**

---

**04.07.2022–22.07.2022** Szkolenia w zakresie: szkolenia dla osób odpowiedzialnych za planowanie procedur i doświadczeń oraz za ich przeprowadzanie, szkolenia dla osób wykonujących procedury oraz szkolenia dla osób uśmiercających zwierzęta wykorzystywane w procedurach. Polskie Towarzystwo Nauk o Zwierzętach Laboratoryjnych PolLASA.

**16.10.2021** Szkolenie dla osób uczestniczących w wykonywaniu procedur na zwierzętach. Wydziałowy Zespół ds. Dobrostanu Zwierząt, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analizy Medycznej.

---

**05.02.2020–07.02.2020** Chromatografia cieczowa (HPLC) w praktyce. Wykłady i zajęcia laboratoryjne. Centrum Edukacji w Lublinie.

**13.02.2020–14.02.2020** Starzenie się krwinek czerwonych prawidłowych, przechowywanych oraz w patologiach. Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego w Warszawie.

## **Nagrody**

---

**2021/2022** Stypendium Prorektora ds. Kształcenia Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku za osiągnięcia naukowe

## **Udział w studenckich kołach naukowych**

---

**2016-2018** Członek Studenckiego Koła Naukowego przy Zakładzie Diagnostyki Biochemicznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

**2018-2019** Przewodnicząca Studenckiego Koła Naukowego przy Zakładzie Diagnostyki Biochemicznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

**2017-2019** Członek Studenckiego Koła Naukowego przy Zakładzie Diagnostyki Hematologicznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

## Zestawienie publikacji

<b>Rodzaj publikacji/osiągnięć</b>	<b>Liczba</b>	<b>Impact Factor</b>	<b>Punktacja MEiN</b>
Prace przeglądowe włączone do rozprawy	1	4.645	140
Prace oryginalne włączone do rozprawy	1	5.6	140
Prace oryginalne niewłączone do rozprawy	5	20.506	680
Polski rozdział w monografii	1	-	20
Streszczenia zjazdowe	8	-	-
<b>Razem</b>	<b>16</b>	<b>30.751</b>	<b>960</b>

## Rozprawa doktorska

### Wpływ hipoksji normobarycznej na powysiłkowe zmiany metabolizmu sfingozyno-1-fosforanu we krwi kolarzy

mgr Katarzyna Hodun

Promotor pracy: prof. dr hab. Marcin Baranowski

#### 1. Artykuły stanowiące cykl prac włączonych do rozprawy doktorskiej

Nazwa czasopisma	Tytuł artykułu	Impact Factor	MEiN	Data publikacji	Rodzaj publikacji
<i>Scandinavian Journal of Medicine &amp; Science in Sports</i>	Sphingosine-1-phosphate in acute exercise and training	4.645	140	06.01.2021	Praca przeglądowa
<i>Biology of Sport</i>	The effect of normobaric hypoxia on acute exercise-induced changes in blood sphingoid base-1-phosphates metabolism in cyclists	5.6	140	17.08.2023 (data akceptacji)	Praca oryginalna

## 2. Wykaz stosowanych skrótów i oznaczeń

BCA – (ang. *bicinchoninic acid*) – kwas bichoninowy

BSA – (ang. *bovine serum albumin*) – surowicza albumina bydłęca

CER – (ang. *ceramide*) – ceramid

dhCER – (ang. *dihydroceramide*) – dihydroceramid

dhSFO – (ang. *dihydrosphingosine*) – dihydrosfingozyna

dhS1P – (ang. *dihydrosphingosine-1-phosphate*) – dihydrosfingozyno-1-fosforan

FAME – (ang. *fatty acid methyl esters*) – estry metylowych kwasów tłuszczowych

GE – (ang. *graded exercise*) – wysiłek o wzrastającym obciążeniu

GLC – (ang. *gas-liquid chromatography*) – chromatografia gazowo-cieczowa

HDL – (ang. *high-density lipoprotein*) – lipoproteiny o wysokiej gęstości

HIF-1 – (ang. *hypoxia-inducible factor 1*) – czynnik indukowany hipoksją 1

LDL – (ang. *low-density lipoprotein*) – lipoproteiny o niskiej gęstości

PBS – (ang. *phosphate-buffered saline*) – buforowana fosforanem sól fizjologiczna

SFO – (ang. *sphingosine*) – sfingozyna

SM – (ang. *sphingomyelin*) – sfingomielina

SphK – (ang. *sphingosine kinase*) – kinaza sfingozyny

S1P – (ang. *sphingosine-1-phosphate*) – sfingozyno-1-fosforan

S1PR – (ang. *sphingosine-1-phosphate receptors*) – receptory sfingozyno-1-fosforanu

TT – (ang. *time trial*) – próba czasowa

TLC – (ang. *thin-layer chromatography*) – chromatografia cienkowarstwowa

UPLC – (ang. *ultra-performance liquid chromatography*) – ultrasprawną chromatografią cieczą

VLDL – (ang. *very low density lipoprotein*) – lipoproteiny o bardzo niskiej gęstości

### 3. Wstęp

#### 3.1. Wysiłek fizyczny w warunkach hipoksji

Ekspozycja organizmu na warunki hipoksyczne powoduje aktywację licznych procesów adaptacyjnych, które prowadzą do zwiększenia wydolności fizycznej organizmu. Stąd też, metoda ta od lat jest powszechnie wykorzystywana przez sportowców w celu poprawy wyników m.in. w dyscyplinach wytrzymałościowych lub szybkościowo-siłowych [1]. Zarówno odpoczynek, jak i wysiłek fizyczny w warunkach wysokościowych prowadzą do hipoksji, inaczej niedotlenienia, czyli stanu spowodowanego niewystarczającym transportem tlenu do tkanek względem zapotrzebowania [2]. Do korzystnych efektów wynikających z ekspozycji organizmu na hipoksję zaliczamy m.in. wzrost wydzielania erytropoetyny, co w konsekwencji skutkuje zwiększeniem liczby krwinek czerwonych oraz zawartości hemoglobiny przyczyniając się do wzrostu pojemności tlenowej krwi, a co za tym idzie do poprawy wydolności tlenowej organizmu [3,4]. Dodatkowo, wyróżniamy również szereg efektów niehematologicznych, które skutkują poprawą możliwości wysiłkowych i występują nawet już po krótkiej ekspozycji na hipoksję, tj. wzrost gęstości mitochondriów, kapilaryzacji tkanki mięśniowej oraz angiogenezy, jak również zwiększona aktywność enzymów glikolitycznych i oksydacyjnych. Powyższe zmiany odzwierciedla poprawa parametrów w próbach wydolnościowych. W tym celu obecnie bardzo często jest wykorzystywana hipoksja normobaryczna, która pozwala na symulację w specjalnych komorach warunków wysokogórskich [5,6].

Mechanizm hipoksji normobarycznej opiera się na sztucznej zmianie składu mieszaniny oddechowej, a mianowicie zmniejszenia w niej procentowej zawartości tlenu poprzez rozrzedzenie powietrza azotem przy jednocześnie niezmiennym ciśnieniu barometrycznym występującym na poziomie morza. Innym mechanizmem charakteryzuje się obserwowana w naturalnych warunkach wysokogórskich hipoksja hipobaryczna, która jest spowodowana obniżeniem ciśnienia atmosferycznego na wysokości w efekcie czego jest zmniejszone również ciśnienie parcjalne tlenu [7].

Hipoksja normobaryczna może być stosowana w celu utrzymania efektów uzyskanych na wysokości po powrocie sportowców na nizinę, zwiększenia zdolności wysiłkowych na poziomie morza, aklimatyzacji przed zawodami na dużej wysokości lub jej przyspieszenia przed wyjazdem do wysokogórskich ośrodków treningowych.

Trening wysokościowy stał się w wielu przypadkach standardowym protokołem wykorzystywanym w licznych dyscyplinach sportowych, m.in. w kolarstwie [8].

### 3.2. Metabolizm i transport sfingozyno-1-fosforanu

Sfingozyno-1-fosforan (S1P) jest pochodną sfingolipidów będących nie tylko głównymi komponentami błon komórkowych wszystkich komórek eukariotycznych, ale również aktywnymi biologicznie mediatorami lipidowymi zaangażowanymi w wewnątrzkomórkową transmisję sygnałów [9].

Wszystkie komórki są zdolne do syntezy S1P, jednakże jego poziom w większości tkanek jest niski. Płytki krwi i erytrocyty uważane są za magazyny S1P, ze względu na wysoką aktywność kinazy sfingozyny (SphK), enzymu odpowiedzialnego za syntezę S1P oraz niewielką aktywność enzymów powodujących degradację tego związku. Pomimo, iż oba typy komórek przechowują duże ilości S1P to w normalnych warunkach płytki krwi go nie uwalniają, gdyż wymagają do tego aktywacji, stąd też nie są istotnym źródłem osoczowego S1P [10–12]. Spontaniczne uwalnianie tego sfingolipidu zachodzi natomiast w erytrocytach i komórkach śródbłonna naczyń dlatego też, uznawane są one za główne źródła krążącego S1P [13,14]. Badania wykazały brak zależności pomiędzy liczbą płytek krwi, a stężeniem S1P we krwi. Odwrotną sytuację obserwuje się natomiast w przypadku erytrocytów, gdzie występuje silna korelacja pomiędzy ich liczbą, a poziomem krążącego sfingolipidu [15]. Dowodem tego są również badania, które ukazują znacznie niższą zawartość S1P w osoczu ludzi z anemią w porównaniu do osób zdrowych [16]. Białkiem odpowiedzialnym za uwalnianie tego związku z erytrocytów i płytek krwi jest przenośnik z nadrodziny 2b (Mfsd2b, ang. *major facilitator superfamily transporter 2b*). Natomiast w komórkach śródbłonna naczyń funkcję tę pełni transporter typu Spns2 (ang. *spinster homolog 2*) [17,18].

S1P występuje w wysokim stężeniu w osoczu krwi człowieka, głównie w połączeniu z lipoproteinami o wysokiej gęstości (HDL) oraz albuminami. Co więcej, właściwości biologiczne i metabolizm S1P zależne są od typu nośnika z jakim jest on związany. Tak więc, S1P połączony z HDL charakteryzuje się znacznie silniejszą aktywnością biologiczną i wyraźnie dłuższym okresem półtrwania w porównaniu z połączeniem z albuminami [16,19].

Ceramid (CER), jako prekursorowa cząsteczka S1P, pochodzi z katabolizmu błonowej sfingomieliny (SM) lub z reakcji kondensacji seryny i palmito-koenzymu



A w szlaku syntezy *de novo*. CER pod wpływem enzymu ceramidazy (CDase) zostaje przekształcony w sfingozynę (SFO). W kolejnym etapie w wyniku fosforylacji SFO pod wpływem SphK wytwarzany jest S1P [16,20]. Degradacja tego związku może zachodzić na dwa sposoby, odwracalny i nieodwracalny. W pierwszym przypadku S1P może być defosforylowany do wolnej sfingozyny przez fosfatazę S1P (SPP) lub fosfohydrolazę fosforanów lipidów (LPP). Nieodwracalna reakcja zachodzi, gdy następuje rozkład przez liazę S1P (S1PL) z wytworzeniem heksadecenalalu i fosforanu etanoloaminy [21].

Zewnątrzkomórkowy mechanizm działania S1P na komórki polega na wiązaniu się tej cząsteczki z grupą swoistych receptorów błonowych sprzężonych z białkiem G (S1PR1–S1PR5), natomiast wewnątrzkomórkowo S1P działa jako przekaźnik drugiego rzędu [17]. Badania wykazały, że cząsteczka ta reguluje liczne procesy komórkowe, do których zaliczamy proliferację, różnicowanie, migrację i hamowanie apoptozy [16]. W zależności od rodzaju aktywowanego receptora osoczowy S1P pełni w organizmie istotne funkcje fizjologiczne m.in. uczestniczy w utrzymaniu integralności bariery śródbłonkowej, regulacji funkcji komórek odpornościowych, angiogenezie czy też w utrzymaniu prawidłowego napięcia naczyniowego [11,22].

### **3.3. Rola sfingozyno1-fosforanu w funkcjonowaniu mięśni szkieletowych i adaptacji do wysiłku fizycznego**

Zewnątrzkomórkowy S1P odgrywa znaczącą rolę w czynności mięśni szkieletowych. Przede wszystkim zidentyfikowano go jako czynnik promujący regenerację mięśni poprzez aktywację komórek satelitarnych, stymulację różnicowania mioblastów oraz tworzenie nowych miofibrili [23–25]. Co ciekawe, egzogenne podawanie S1P myszom mdx, będących zwierzęcym modelem dystrofii mięśniowej Duchenne, hamowało proces atrofii mięśni podczas, gdy inaktywacja tego związku przyspieszała redukcję masy mięśniowej [26]. Wewnątrzkomórkowy S1P osłabia proces zmęczenia mięśni, a efekt ten prawdopodobnie wiąże się z faktem, iż S1P wpływa na sprzężenie elektromechaniczne w miocytach na poziomie receptora rianodynowego regulując w ten sposób uwalnianie  $Ca^{2+}$  z cystern brzeżnych siateczki sarkoplazmatycznej [27]. Ponadto, S1P dzięki obecności kinazy sfingozyny 2 (SphK2) w wewnętrznej błonie komórkowej mitochondriów utrzymuje ich prawidłowe funkcjonowanie zapewniając właściwą syntezę ATP [28]. Dodatkowo, S1P zwiększa pojemność oksydacyjną tych organelli, tym samym nasilając utlenianie

kwasów tłuszczowych [29] oraz za pośrednictwem koaktywatora 1 $\alpha$  receptora  $\gamma$  aktywowanego przez proliferatory peroksysomów (PGC-1 $\alpha$ ) promuje biogenezę mitochondriów [30]. Wyżej wymienione korzystne efekty S1P na biologię tkanki mięśniowej zachodzą szczególnie na skutek aktywacji osi S1P/S1PR<sub>1-2</sub> [31]. W świetle powyższych badań uznaje się, iż lipid ten wpływając na metabolizm, siłę, kurczliwość i masę mięśni szkieletowych odgrywa istotną rolę w ich adaptacji do wysiłku fizycznego.

Prowadzone na przestrzeni ostatnich dwóch dekad badania wykazały, że aktywność fizyczna ma znaczący wpływ na metabolizm S1P zarówno we krwi, jak i w mięśniach szkieletowych [32]. Stwierdzono, podwyższenie stężenia S1P we krwi osób niewytrenowanych po zakończeniu jednorazowego wysiłku o średniej intensywności. Jednakże takiego efektu nie zaobserwowano u sportowców wytrzymałościowych, którzy charakteryzowali się wyższym wyjściowym stężeniem S1P w osoczu [33]. Warte uwagi jest to, że wzrost osoczowego S1P również potwierdzono u osób wytrenowanych, ale tylko na skutek wykonania ćwiczeń o wysokiej intensywności. Zawartość S1P w ludzkich mięśniach szkieletowych wzrasta proporcjonalnie do czasu trwania i intensywności wysiłku fizycznego [34]. Co ciekawe, trening wytrzymałościowy skutkowało wzrostem stężenia osoczowego S1P w połączeniu z HDL, a efekt ten był powiązany z nasiloną aktywnością SphK w erytrocytach oraz wzmożonym uwalnianiem z nich S1P [19]. Interesującym wydaje się być fakt, iż S1P związany z HDL posiada również silne właściwości przeciwmiażdżycowe. Inhibicja receptorów dla S1PR, głównie S1PR<sub>3</sub> osłabiła protekcyjny wpływ HDL na mięsień sercowy [35,36]. Zatem, prewencyjne działanie tego kompleksu może być jednym z mechanizmów wyjaśniających zmniejszenie ryzyka chorób sercowo-naczyniowych u osób utrzymujących regularną aktywność fizyczną.

Powyższe doniesienia, sugerują istotny wpływ S1P na zmiany zachodzące w organizmie na skutek wysiłku, a zwłaszcza podkreślają rolę tego lipidowego związku w adaptacji mięśni szkieletowych do wysiłku fizycznego.

**Szczegółowe informacje na temat wpływu wysiłku fizycznego na metabolizm S1P zostały przedstawione w pracy przeglądowej wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej:** Hodun K., Chabowski A., Baranowski M.: Sphingosine-1-phosphate in acute exercise and training. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 2021; 31: 945-955.

### 3.4. Wpływ hipoksji na metabolizm sfingozyno-1-fosforanu

Liczne badania wskazują, iż hipoksja jest jednym z czynników stymulujących produkcję S1P. Wzrost stężenia osoczowego S1P wykazano u zdrowych osób już po pierwszym dniu ekspozycji na hipoksję w czasie spoczynku na wysokości 5260 m n.p.m. Co więcej, z każdym kolejnym dniem eksperymentu u uczestników badania obserwowano dalszy wzrost zawartości S1P we krwi. Równolegle, stwierdzono wzrost aktywności kinazy sfingozyny 1 (SphK 1, izoforma enzymu występująca głównie w cytoplazmie komórek) i stężenia S1P w erytrocytach [37]. Ponadto, badania przeprowadzone na myszach ujawniły, iż wewnątrzkomórkowy S1P promuje wiązanie odtlenowanej hemoglobiny z błoną erytrocytów, co indukuje glikolizę, jednocześnie wzmagając produkcję 2,3-difosfoglicerynianu (2,3-DPG), który poprzez stymulację uwalniania O<sub>2</sub> chroni przed niedotlenieniem tkanek [37]. Zatem, krążący S1P może pełnić kluczową rolę w adaptacji mięśni do wysiłku hipoksycznego.

Istnieją również doniesienia sugerujące, iż S1P jest potencjalnym aktywatorem czynnika indukowanego przez hipoksję 1 (HIF-1), który jest kluczowym regulatorem homeostazy tlenowej, a jego aktywacja odpowiada za większość mechanizmów przystosowawczych do hipoksji, zarówno tych hematologicznych, jak i niehematologicznych [38,39]. Wykazano, iż trzydniowe, dożylnie podawanie S1P szczurom przed poddaniem ich ekspozycji na hipoksję spowodowało aktywację HIF-1 oraz ograniczenie patologicznych zmian m.in. stanu zapalnego czy też zaburzeń równowagi redoks, wywołanych 6-godzinną ekspozycją na symulowaną wysokość 7620 m n.p.m. [40]. Ponadto, niektóre badania sugerują, iż wewnątrzkomórkowy S1P obniża ekspresję genów prozapalnych [41,42].

#### 4. Cele pracy

Ze względu na stale rosnącą popularność i dostępność turystyki wysokogórskiej kwestie związane z adaptacją ludzkiego organizmu do hipoksji stają się ważne dla coraz większej liczby osób. Pomimo licznych badań mechanizmy odpowiedzialne za korzystny wpływ wysiłku wysokogórskiego na wydolność fizyczną organizmu pozostają jak dotąd niejasne. Liczne dane literaturowe, dowodzą, iż aktywność fizyczna ma znaczący wpływ na metabolizm sfingozyno-1-fosforanu (S1P), związku pełniącego istotną rolę w biologii mięśni szkieletowych oraz zaangażowanego w zmiany adaptacyjne zachodzące w następstwie wysiłku. Badania wykazały, iż pojedynczy wysiłek fizyczny oraz trening powodują wzrost stężenia S1P we krwi. Co ciekawe, ekspozycja na hipoksję w czasie spoczynku również skutkuje wzrostem osoczonego S1P. Postawiłam zatem hipotezę, że wzrost stężenia S1P w odpowiedzi na jednorazowy wysiłek fizyczny jest nasilany przez jednoczesną ekspozycję na niedotlenienie.

W związku z powyższym, celem niniejszej pracy było ustalenie wpływu hipoksji normobarycznej na powysiłkowe zmiany S1P we krwi kolarzy. Realizacja niniejszego projektu miała też przyczynić się do wyjaśnienia czy korzystne efekty wynikające z ekspozycji na niedotlenienie są powiązane ze zmianami stężenia S1P we krwi. Zarówno komórki krwi, jak i główne frakcje osocza były analizowane w tym samym czasie, dlatego też otrzymane wyniki dostarczyły cennych informacji na temat metabolizmu krążącego S1P.

Mając na uwadze powyższe, celem zrealizowanych badań była:

1. Ocena wpływu hipoksji normobarycznej na powysiłkowe zmiany metabolizmu sfingolipidów we krwi kolarzy po przeprowadzeniu wysiłku na cykloergometrze o wzrastającym obciążeniu, aż do wyczerpania.
2. Ocena wpływu hipoksji normobarycznej na powysiłkowe zmiany metabolizmu sfingolipidów we krwi kolarzy po przeprowadzeniu symulowanej 30km kolarskiej próby czasowej.

## 5. Materiały i metody

### 5.1. Charakterystyka badanych

Badaniem objęto 15 wykwalifikowanych kolarzy o średnim wieku  $25,4 \pm 8,4$  lat, BMI wynoszącym  $21,6 \pm 1,8$  kg/m<sup>2</sup> i procentowej zawartości tłuszczu w organizmie na poziomie  $9,2 \pm 2,1\%$ . Średni staż treningowy uczestników badania wynosił  $6,3 \pm 2$  lat, a ich maksymalny pobór tlenu  $61,4 \pm 3,1$  mL/kg/min. Poza doświadczeniem treningowym, kolejnym zasadniczym kryterium kwalifikacji była minimum 6-miesięczna przerwa od ostatniego treningu wysokościowego. Wszyscy uczestnicy posiadali aktualne badania lekarskie wykluczające przeciwwskazania do przeprowadzania intensywnych wysiłków fizycznych. Ponadto, każdy z ochotników przedłożył pisemną zgodę świadomego i dobrowolnego uczestnictwa w eksperymencie. Uczestnicy zostali również poinformowani o możliwość rezygnacji z udziału w projekcie badawczym bez podania przyczyny na każdym etapie jego trwania. W okresie obejmującym eksperyment badani byli zobowiązani do zachowania swojej standardowej diety i suplementacji.

Projekt badawczy został sfinansowany przez Narodowe Centrum Nauki w ramach grantu OPUS 16 o numerze 2018/31/B/NZ7/02543 oraz zatwierdzony przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku (nr zgody R-I-002/325/2019).

### 5.2. Przebieg eksperymentu

Uczestnicy zostali poddani dwóm rodzajom jednorazowego wysiłku fizycznego:

1. Jazda na cykloergometrze o wzrastającym obciążeniu, aż do wyczerpania (GE, *ang.* graded exercise). Wysiłek o wysokiej intensywności, częściowo beztlenowy. Ćwiczenia rozpoczęto od obciążenia 120 W, które zwiększano o 40 W co 3 min.
2. Symulowana 30km kolarska próba czasowa (TT, *ang.* time trial). Długotrwały wysiłek o charakterze tlenowym.

Oba powyższe testy zostały przeprowadzone w warunkach normoksji i hipoksji normobarycznej ( $FiO_2=16,5\%$ , co odpowiada  $\sim 2000$  m n.p.m.) w sali wyposażonej w system umożliwiający regulację procentowej zawartości tlenu w powietrzu (AirZone 25, Air Sport, Międzyzdroje, Polska). W przypadku GE całkowity czas ekspozycji na hipoksję wyniósł około 35 min, natomiast w TT około 90 min. Przed rozpoczęciem wysiłku w warunkach niedotlenienia badani byli eksponowani na hipoksję 15 min przed startem właściwego testu. Uczestnicy badania podczas pobytu w ośrodku spożywali identyczne posiłki (40 kcal/kg/dzień, 50% węglowodanów, 30% tłuszczu i 20% białka).

Randomizowane sesje wysiłkowe zostały zrealizowane w odstępie dwóch tygodni, a badani nie byli świadomi warunków wykonywania ćwiczenia. Testy zostały przeprowadzone pod nadzorem wykwalifikowanych trenerów sportowych. Saturacja krwi tlenem i częstotliwość akcji serca kontrolowano za pomocą pulsoksymetru (WristOx2, Nonin Medical Inc., Plymouth, USA). Ćwiczenia wykonano na indywidualnych rowerach sportowców połączonych z elektromagnetycznym trenerem kolarskim (Cyclus 2, RBM Elektronik-Automation GmbH, Leipzig, Niemcy).

Do próbek o objętości 4 ml z obecnym antykoagulantem EDTA (wersenian potasu) pobrano krew z żyły łokciowej w trzech punktach czasowych tj.: przed rozpoczęciem wysiłku (*basal*), natychmiast po jego zakończeniu (*post-exercise*) oraz po 30-minutowym odpoczynku (*recovery*). W poprzednich badaniach stwierdzono, iż największe zmiany w metabolizmie S1P zachodzą 30 minut po zakończeniu wysiłku [33].

Szczegółowa analiza pozyskanego materiału obejmowała:

1. Ocenę zawartości sfingozyno-1-fosforanu (S1P), dihydrosfingozyno-1-fosforanu (dhS1P), sfingozyny (SFO) i dihydrosfingozyny (dhSFO) w osoczu, albuminach oraz frakcji lipoprotein o wysokiej gęstości (HDL) – metoda ultrasprawniej chromatografii cieczowej (UPLC)
2. Ocenę zawartości S1P, dhS1P, SFO, dhSFO, ceramidu (CER) i dihydroceramidu (dhCER) w erytrocytach i płytkach krwi – metoda UPLC
3. Ocenę zawartości sfingomieliny (SM) w erytrocytach i płytkach krwi – metoda chromatografii gazowo-cieczowej (GLC)
4. Ocenę tempa uwalniania S1P i dhS1P z erytrocytów zawieszonych w osoczu.

### **5.3. Frakcjonowanie krwi**

Frakcjonowanie krwi wykonano w celu pozyskania erytrocytów, płytek krwi i osocza. Na każdym etapie procedury utrzymywano temperaturę 4°C, gdyż wykazano, iż w tej temperaturze nie zachodzi uwalnianie S1P z krwinek [16]. Bezpośrednio po pobraniu próbki krwi zostały delikatnie wymieszane i umieszczone w lodzie do czasu wirowania. W pierwszej kolejności krew odwirowano przy przeciążeniu 380×g przez 10 min w celu separacji osocza i erytrocytów. Uzyskane osocze bogatopłytkowe przeniesiono do nowych próbek i odwirowano przy 2500×g przez 10 min u celu wyizolowania na dnie próbki płytek krwi. Po odwirowaniu osocze ubogopłytkowe przeniesiono do czystych próbek i wirowano po raz kolejny (5000×g przez 10 min), aby dokładnie usunąć pozostałości płytek krwi. Uzyskane w poprzednim wirowaniu płytki krwi przepłukano uprzednio schłodzonym roztworem

buforowanej fosforanem soli fizjologicznej (PBS), a następnie zawieszono w tym samym buforze i zamrożono. Z pierwotnych próbek zawierających krwinki czerwone dokładnie usunięto pozostałości osocza oraz warstwę krwinek białych. Erytrocyty zostały przepłukane przy użyciu buforu PBS i odwirowane przy obciążeniu  $800\times g$  przez 10 min. Po dokładnym usunięciu supernatantu krwinki czerwone zostały zawieszono w PBS i zamrożono. Uzyskane osocze, erytrocyty i płytki krwi były przechowywane w temperaturze  $-80^{\circ}C$  do czasu dalszych analiz.

#### **5.4. Tempo uwalniania S1P i dhS1P**

W celu oceny uwalniania S1P i dhS1P z krwinek czerwonych zmieszano ze sobą równe objętości erytrocytów i osocza (0,8 ml) pochodzące z tej samej próbki krwi, wyizolowane w sposób opisany powyżej. Następnie połowę tak przygotowanej zawiesiny przeniesiono do nowej próbki i odwirowano w temperaturze  $4^{\circ}C$  przy  $800\times g$  przez 10 min. Supernatant z wirowania został zebrany do nowej próbki i zamrożony. Pozostałą część zawiesiny inkubowano 20 min w temperaturze  $37^{\circ}C$  w atmosferze 5%  $CO_2$ . Po inkubacji próbki zostały natychmiast schłodzone, odwirowane jak poprzednio, a supernatant przeniesiono do nowej próbki i zamrożono.

Ilość uwolnionego S1P i dhS1P obliczono jako różnicę początkowego stężenia tych związków w osoczu i ich zawartości po zakończonej inkubacji. Oznaczenia wykonano za pomocą ultrasprawniej chromatografii cieczowej, opisanej poniżej.

#### **5.5. Izolacja lipoprotein osocza**

Lipoproteiny HDL oraz albuminy wyizolowano z osocza metodą trzech sekwencyjnych ultrawirowań (ultrawirówka Sorvall RC M120 GX, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) przy wzrastającej gęstości roztworu. Na każdym etapie procedury obecny był EDTA, który zapobiegał oksydacji lipoprotein.

W pierwszej kolejności, aby wyizolować lipoproteiny o bardzo niskiej gęstości (VLDL) na 600  $\mu l$  osocza delikatnie nawarstwiono 300  $\mu l$  wodnego roztworu NaCl o gęstości 1,006 g/mL, który następnie odwirowano z prędkością 120.000 rpm, 85 min, w temperaturze  $8^{\circ}C$ . Po zakończeniu wirowania usunięto 300  $\mu l$  górnej frakcji zawierającej VLDL. Do pozostałej ilości próbki dodano 300  $\mu l$  roztworu NaBr, dokładnie wymieszano (gęstość tak przygotowanej mieszaniny wyniosła 1,063 g/mL) i po raz kolejny odwirowano z prędkością 120.000 rpm, 155 min, w temperaturze  $8^{\circ}C$ . Po czym zebrano ponownie 300  $\mu l$  górnej warstwy mieszaniny, ale tym razem zawierającej lipoproteiny o niskiej gęstości (LDL). Trzecie, a jednocześnie ostateczne

wirowanie (120.000 rpm, 260 min, 8°C) z NaBr przy gęstości roztworu wynoszącej 1,21 g/mL pozwoliło na wyizolowanie 300 µl górnej warstwy mieszaniny zawierającej HDL oraz 300 µl mieszaniny z dna próbówki zawierającej frakcję albumin. Gęstość roztworów używanych do izolacji weryfikowano za pomocą cyfrowego densytometru (Mettler Toledo, Columbus, USA). Zebrane HDL i albuminy natychmiast umieszczono w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze -80°C do czasu dalszych analiz.

## **5.6. Oznaczenie zawartości sfingolipidów metodą UPLC**

Zawartość S1P, dhS1P, sfingozyny, dihydrosfingozyny, ceramidu i dihydroceramidu oznaczono za pomocą ultrasprawniej chromatografii cieczowej. W pierwszym etapie po dodaniu standardów wewnętrznych (C17-sfingozyny i C17-sfingozyno-1-fosforanu, Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA) i roztworu metanolu z kwasem solnym próby umieszczono w lodzie i poddano sonifikacji. W celu ekstrakcji lipidów do próbówki dodano chloroform, 1M NaCl oraz 3N NaOH i odwirowano (3000 rpm, 5 min, 4°C). Następnie wierzchnią, wodną warstwę zawierającą S1P i dhS1P przeniesiono do nowych próbek. Podczas dwóch kolejnych wirowań z mieszaniną metanolu/1M NaCl (1:1, v/v) i 3N NaOH dokładnie wypłukano pozostałości fosforylowanych zasad sfingoidowych w warstwie chloroformowej. Zawartość S1P i dhS1P oznaczano metodą pośrednią, gdyż do zebranych wodnych frakcji dodano fosfatazę alkaliczną (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) powodując ich defosforylację odpowiednio do SFO i dhSFO. Dodatkowo, z pierwotnej warstwy chloroformowej przeniesiono niewielką objętość wyekstrahowanych lipidów do nowej próbówki zawierającej standard wewnętrzny N-palmitoilo-D-erytro-C17 sfingozynę (Avanti Polar Lipids). Próbę odparowano pod azotem, dodano 1M KOH w 90% metanolu i poddano godzinnej inkubacji w celu hydrolizy alkalicznej dihydroceramidu i ceramidu odpowiednio do dihydrosfingozyny i sfingozyny.

Wszystkie warstwy chloroformowe przeniesiono do nowych próbek, odparowano pod azotem, a następnie lipidy rozpuszczono w etanolu. Defosforylowane zasady sfingoidowe, sfingozyna i dihydrosfingozyna pochodzące z ceramidu i dihydroceramidu oraz wolne sfingozyna i dihydrosfingozyna zostały następnie poddane derywatyzacji (z wykorzystaniem o-ftalodialdehydu). Uzyskane w tym procesie o-ftalaldehydowe pochodne sfingolipidów wykazujące fluorescencję analizowano przy pomocy systemu UPLC (Nexera, Shimadzu Corp., Kioto, Japan) wyposażonego w detektor fluorescencyjny (RF-20Axs) oraz kolumnę C18 (Reproshell ODS-1, Dr Maisch, Ammerbuch, Germany), której temperatura utrzymywana była



na poziomie 30°C. Fazę ruchomą stanowiła izokratyczna mieszanina acetonitrylu i wody (84:16, v/v). Szybkość przepływu wynosiła 0,4mL/min.

### **5.7. Oznaczenie zawartości sfingolipidów metodą GLC**

Zawartość sfingomieliny w erytrocytach i płytkach krwi oznaczono metodą chromatografii gazowo-cieczowej. Lipidy wyekstrahowano z komórek krwi stosując roztwór złożony z metanolu z butylowanym hydroksytoluenem (0,01%) i chloroformu. Warstwa chloroformowa przeniesiona została do nowych probówek i odparowana pod azotem. Lipidy rozpuszczono w roztworze chloroform:metanol w proporcji 2:1. Następnie frakcja sfingomieliny została wyodrębniona metodą chromatografii cienkowarstwowej (TLC) na płycie z żelem krzemionkowym, którą umieszczono w roztworze rozwijającym składającym się z chloroformu, metanolu, kwasu octowego i wody destylowanej (odpowiednio w proporcjach 50:37,5:3,5:2). Poszczególne klasy lipidów uwidoczniono roztworem fluoresceiny (44mg/20ml metanolu) i zidentyfikowano pod światłem UV. Pasma żelu odpowiadające wzorcowi sfingomieliny zostały zdrapane z płytek i przeniesione do nowych probówek zawierających kwas pentadekanowy jako wzorec wewnętrzny. Kwasy tłuszczowe sfingomieliny były następnie transmetylowane w obecności roztworu 14% trifluorku boru z metanolem w temperaturze 100°C przez 90 minut, a uzyskane estry przed analizą zostały rozpuszczone w heksanie.

Otrzymane estry metylove kwasów tłuszczowych (FAME) analizowano z wykorzystaniem aparatu Hewlett-Packard 5890 Series II wyposażonego w system z podwójnym detektorem jonizacji płomieniowej i kolumną kapilarną CP-Sil 88 (100 m, 0,25 mm i.d., Agilent, Santa Clara, CA, USA). Zawartość sfingomieliny została przedstawiona jako suma wszystkich analizowanych estrów metylowych kwasów tłuszczowych w tej frakcji.

### **5.8. Oznaczenie białka**

Stężenie białka w osoczu, albuminach, frakcji HDL i płytkach krwi oznaczono metodą kolorymetryczną z użyciem kwasu bicynchoninowego (BCA). Przygotowano odpowiednie rozcieńczenia poszczególnych prób. Jako standardu użyto albuminy BSA (bovine serum albumin, Sigma). Zarówno krzywą, jak i próby oznaczano w tryplikacie. Po przygotowaniu płytkę poddano 30-minutowej inkubacji na wstrząsarce laboratoryjnej, 300 rpm, w temperaturze 37°C. Do zmierzenia absorbancji (długość fali 560 nm) wykorzystany został czytnik mikropłytek Synergy H1 (Hybrid Reader, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA).

## **5.9. Oznaczenie stężenia hemoglobiny**

Stężenie hemoglobiny w erytrocytach oznaczono metodą kolorymetryczną z wykorzystaniem zestawu z odczynnikiem Drabkina (Sigma, Saint Louis, USA). Niewielką ilość erytrocytów poddano 15-minutowej inkubacji z uprzednio przygotowanym roztworem Drabkina. Po tym czasie dokonano odczytu absorbancji na spektrofotometrze (Beckman DU 640, Brea, USA) przy długości fali 540nm.

## **5.10. Statystyka**

Wszystkie wyniki zostały zaprezentowane jako średnia  $\pm$  odchylenie standardowe (SD). Analizę statystyczną wyników przeprowadzono z wykorzystaniem dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) połączonej z testem t-studenta dla prób zależnych. Dla porównań wielokrotnych zastosowano korektę Benjamina-Hochberga. Za poziom istotności statystycznej uznano  $p < 0,05$ .

## 6. Wyniki

**Szczegółowe omówienie uzyskanych wyników znajduje się w pracy oryginalnej, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej:**

The effect of normobaric hypoxia on acute exercise-induced changes in blood sphingoid base-1-phosphates metabolism in cyclists.

Katarzyna Hodun, Miłosz Czuba, Kamila Płoszczyca, Jerzy Sadowski, Józef Langfort, Adrian Chabowski, Marcin Baranowski. *Biology of Sport*, 2023.

**W opisie wyników wykorzystano odniesienia do figur zamieszczonych w wyżej wymienionej publikacji.**

### 6.1. Wysilek o wzrastającym obciążeniu

Intensywny wysilek fizyczny do wyczerpania w warunkach normoksji spowodował istotny statystycznie wzrost stężenia osocznego S1P oraz jego frakcji połączonej z HDL (Ryc. 1). Efekt ten nie został zaobserwowany w warunkach wysokogórskich, co więcej zaobserwowano tu zmniejszenie stężenia S1P i sfingomieliny w erytrocytach po zakończeniu wysiłku, jednakże efekt ten był przejściowy i po 30 minutowym odpoczynku zaobserwowano wzrost S1P i SM w erytrocytach w porównaniu do wartości powysiłkowej. Istotne statystycznie obniżenie powysiłkowego stężenia S1P wykazano również w płytkach krwi, co więcej efekt ten utrzymywał się po 30 minutowym odpoczynku (Tabela 1). Zarówno wysilek w normoksji, jak i hipoksji nie spowodował istotnych statystycznie zmian tempa uwalniania S1P z erytrocytów (Ryc. 3).

### 6.2. Symulowana 30km kolarska próba czasowa

W wyniku 30 km symulowanej próby czasowej zaobserwowano istotny powysiłkowy wzrost stężenia dhS1P zarówno w osoczu, jak i w połączeniu z HDL oraz z albuminami w porównaniu do stężenia początkowego, co więcej zmiana ta utrzymywała się po 30-minutowym odpoczynku (Ryc. 2). Dodatkowo, powysiłkowy wzrost dhS1P stwierdzono również w erytrocytach i płytkach krwi w porównaniu do stężenia bazowego, zmiana ta także utrzymywała się po okresie odpoczynku (Tabela 2). Przeprowadzony eksperyment wykazał istotny statystycznie powysiłkowy wzrost wskaźnika uwalniania dhS1P z erytrocytów w porównaniu do wartości początkowej, który utrzymywał się po 30-minutowym odpoczynku (Ryc. 3). Dostępność tlenu nie miała wpływu na powyższe efekty. W próbie czasowej zaobserwowano powysiłkowe zmniejszenie stężenia osocznego S1P, co więcej nasilenie tego efektu wykazano w warunkach hipoksji (Ryc. 2).

## 7. Wnioski

1. W wyniku długotrwałego wysiłku o charakterze tlenowym dochodzi do wzrostu stężeń sfinganino-1-fosforanu w osoczu, zarówno w połączeniu z HDL, jak i albuminami, będącego konsekwencją nasilenia produkcji i uwalniania tego związku w erytrocytach. Dostępność tlenu nie ma wpływu na powyższe zmiany.
2. W wyniku długotrwałego wysiłku o charakterze tlenowym wykazano redukcję stężenia S1P po 30-minutowym odpoczynku, która dodatkowo była nasiloną w warunkach hipoksycznych.
3. Pojedynczy wysiłek fizyczny o wysokiej intensywności przeprowadzony w prawidłowych warunkach tlenowych spowodował wzrost osoczowego S1P w połączeniu z HDL.
4. Hipoksja zapobiega wzrostowi stężenia sfingozyno-1-fosforanu w osoczu w następstwie pojedynczego wysiłku fizycznego o charakterze beztlenowym, co może wynikać z redukcji zawartości S1P w erytrocytach.

## 8. Publikacja nr 1

Katarzyna Hodun, Adrian Chabowski, Marcin Baranowski

Sphingosine-1-phosphate in acute exercise and training.

*Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*

2021; 31: 945-955

Impact Factor: 4.645 MEiN: 140.

# Sphingosine-1-phosphate in acute exercise and training

Katarzyna Hodun | Adrian Chabowski | Marcin Baranowski 

Department of Physiology, Medical University of Białystok, Białystok, Poland

## Correspondence

Marcin Baranowski, Department of Physiology, Medical University of Białystok, Mickiewicza 2c, 15-222 Białystok, Poland.  
Email: marcin.baranowski@umb.edu.pl

## Funding information

Narodowe Centrum Nauki, Grant/Award Number: 2018/31/B/NZ7/02543; Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, Grant/Award Number: SUB/1/DN/20/001/1118

Sphingosine-1-phosphate (SIP) is a bioactive sphingolipid found in all eukaryotic cells. Although it may function as an intracellular second messenger, most of its effects are induced extracellularly via activation of a family of five specific membrane receptors. Sphingosine-1-phosphate is enriched in plasma, where it is transported by high-density lipoprotein and albumin, as well as in erythrocytes and platelets which store and release large amounts of this sphingolipid. Sphingosine-1-phosphate regulates a host of cellular processes such as growth, proliferation, differentiation, migration, and apoptosis suppression. It was also shown to play an important role in skeletal muscle physiology and pathophysiology. In recent years, SIP metabolism in both muscle and blood was found to be modulated by exercise. In this review, we summarize the current knowledge on the effect of acute exercise and training on SIP metabolism, highlighting the role of this sphingolipid in skeletal muscle adaptation to physical effort.

## KEYWORDS

dhSIP, dihydrosphingosine-1-phosphate, exercise, red blood cells, skeletal muscle, sphinganine-1-phosphate, sphingoid base-1-phosphate, training

## 1 | INTRODUCTION

Sphingolipids constitute an integral component of cell membranes of all eukaryotic organisms.<sup>1</sup> Sphingosine-1-phosphate (SIP) is one of the most biologically active members of this lipid class, and regulates a host of cellular processes, such as growth, proliferation, differentiation, migration, and apoptosis suppression. It was also found to be involved in pathophysiology of many diseases, including cancer, atherosclerosis, diabetes, and osteoporosis.<sup>2</sup>

The biological activity of SIP is mediated mostly by commonly expressed membrane G-protein coupled receptors (SIPRs), for which it acts as a ligand after being secreted to the extracellular space.<sup>3</sup> However, it can also act via intracellular signaling pathways as a second messenger.<sup>4</sup> Each of the five known SIPRs (SIPR<sub>1</sub>-SIPR<sub>5</sub>) has a distinct function and expression pattern. SIPR<sub>1</sub>-SIPR<sub>3</sub> are ubiquitously expressed in tissues. Their presence was found in the brain, skeletal

muscle, heart, kidney, and liver. On the other hand, SIPR<sub>4</sub> is found mainly in lymphoid organs, while SIPR<sub>5</sub> is expressed in the central nervous system.<sup>3</sup>

The key molecule in sphingolipid metabolism is ceramide, which can be degraded by ceramidase to sphingosine and free fatty acid. This reaction is reversible thanks to the ceramide synthase which is responsible for the synthesis of ceramide from sphingosine and acyl-CoA.<sup>5</sup> Sphingosine is phosphorylated to SIP by two isoforms of sphingosine kinase (SphK1 and SphK2). Although both isoforms synthesize the same product, they have different biological properties and cellular localizations. SphK is also able to phosphorylate dihydrosphingosine, an intermediate in the de novo ceramide synthesis pathway, to form dihydrosphingosine-1-phosphate (dhSIP).<sup>6</sup>

Sphingosine-1-phosphate is dephosphorylated back to sphingosine by two enzymes: SIP phosphatase (SPP), and nonspecific lipid phosphate phosphohydrolase (LPP)

with a wide substrate specificity. Another enzyme, namely S1P lyase (S1PL), causes irreversible degradation of S1P into ethanolamine phosphate and hexadecenal (Figure 1).<sup>6</sup> Of note, extracellular S1P can be degraded only by LPP. Two of the three known isoforms of this enzyme, namely LPP1 and LPP3, are localized to the cell membrane, and thus act as ecto-enzymes.<sup>7</sup> SPP and S1PL are located in the endoplasmic reticulum, and, therefore, do not have such capabilities.<sup>6</sup>

Sphingosine-1-phosphate is found at high-nanomolar concentrations in the human plasma, bound mainly to high-density lipoprotein (HDL, 50%-60%) and albumin (30%-40%). The remaining insignificant part is transported by low-density lipoprotein, and very low-density lipoprotein.<sup>8</sup> The major transport protein of S1P in HDL is apolipoprotein M (ApoM).<sup>9</sup> Of note, the biological properties and metabolism of S1P to a large extent depend on the type of carrier. HDL-associated S1P is characterized by a higher biological activity and a much longer half-life compared to the albumin-bound pool.<sup>10</sup>

Vascular endothelial cells (ECs) and erythrocytes (RBCs) have been proven to be the principal sources of circulating S1P.<sup>11,12</sup> RBCs and platelets are characterized by high-SphK activity and low activity of S1P-degrading enzymes, which allows them to store large quantities of this sphingolipid. However, platelets release S1P only after activation, and, therefore, they are not considered to be an important source of plasma S1P under normal conditions. On the other hand, RBCs and ECs release S1P constitutively.<sup>10</sup>

The protein responsible for S1P export from erythrocytes and platelets is the major facilitator superfamily transporter 2b (Mfsd2b), whereas spinster homolog 2 (Spns2) mediates

the release of S1P from ECs.<sup>13,14</sup> It was recently shown that liver is the primary organ responsible for clearance of S1P from blood, which explains the rapid turnover of this sphingolipid in the circulation.<sup>15</sup>

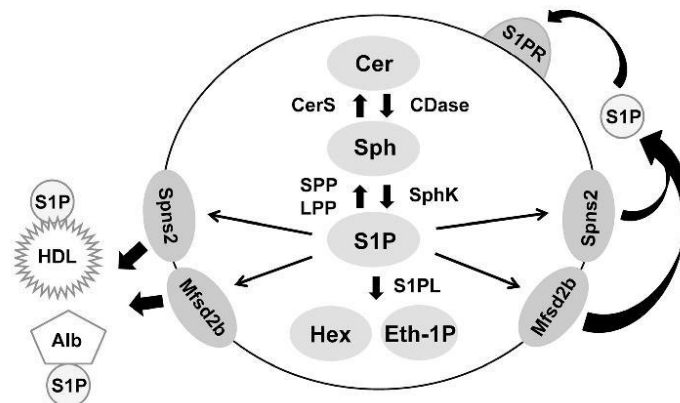
Studies conducted over the last two decades revealed an important role of circulating S1P in physiology and pathophysiology. It is involved in maintaining normal endothelial barrier function, as well as proper vascular tone. In addition, plasma S1P regulates immune cells trafficking, bone homeostasis, and angiogenesis.<sup>11,16,17</sup> HDL-associated S1P is also characterized by strong anti-atherogenic and cardioprotective properties.<sup>18,19</sup>

In recent years, S1P emerged as an important regulator of skeletal muscle function, and metabolism of this sphingolipid was found to be markedly affected by exercise.<sup>20,21</sup> This review summarizes the present state of knowledge on the effect of acute exercise and training on S1P metabolism in blood and muscle, as well as on its role in adaptation to exercise.

## 2 | EFFECT OF ACUTE EXERCISE ON S1P METABOLISM

### 2.1 | Skeletal muscle

The first study investigating the effect of exercise on S1P metabolism in skeletal muscle was published by our group in 2008.<sup>22</sup> We found markedly increased S1P levels in the soleus and red portion of the gastrocnemius muscle in rats subjected to treadmill running until exhaustion. Exercise of shorter duration was less effective in this regard, since muscle S1P content was not affected by a 30-minutes run, and in



**FIGURE 1** Overview of sphingosine-1-phosphate metabolism. Alb, albumin; Cer, ceramide; CDase, ceramidase; CerS, ceramide synthase; Eth-1P, ethanolamine phosphate; HDL, high-density lipoprotein; Hex, hexadecenal; LPP, lipid phosphate phosphatase; Mfsd2b, major facilitator superfamily transporter 2b; S1P, sphingosine-1-phosphate; S1PL, sphingosine-1-phosphate lyase; S1PR, sphingosine-1-phosphate receptor; Sph, sphingosine; SphK, sphingosine kinase; SPNS2, spinster homolog 2; SPP, sphingosine-1-phosphate phosphatase

the case of a 90-min effort it was increased only in the red portion of the gastrocnemius muscle. Interestingly, SIP level in the white portion of this muscle was not increased, regardless of the exercise duration, suggesting that this effect is specific to muscles with higher oxidative capacity. It should be noted, however, that in the same experimental setup SIP content in the left ventricle of the heart was not affected by exercise.<sup>23</sup>

The notion that muscle SIP level increases in proportion to the duration of exercise was subsequently confirmed by our group in the vastus lateralis of subjects performing one-leg knee extension exercise for 120 minutes at 55% of the maximal workload.<sup>21</sup> In the same study, we found that the magnitude of this effect depends also on exercise intensity, since the content of SIP was elevated in response to a 30-minutes effort performed at 55% and 85%, but not at 25% of the maximal workload. Importantly, muscle SIP level in the resting leg was not increased following exercise, suggesting that this effect is mediated by local rather than systemic mechanisms.

In line with our results, Bergman et al<sup>24</sup> found elevated SIP content in muscle biopsies taken from subjects performing a 90-minutes exercise at 50% of  $VO_2$  max on a cycle ergometer. Although this effect was observed regardless of the training and metabolic status, its magnitude was higher in obese, and type 2 diabetic subjects compared to athletes. The observed changes were, however, short-lived as muscle SIP level decreased back to the baseline value following 2 hours of rest.

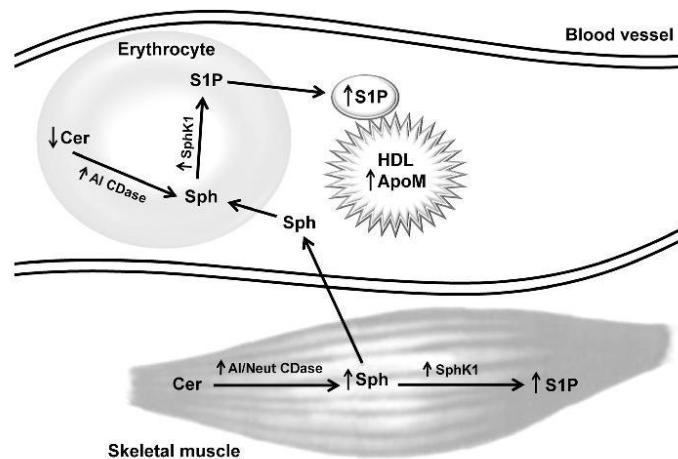
The available data indicate that the exercise-induced increase in muscle SIP content results from higher availability of the substrate required for its synthesis. Accumulation of sphingosine following exercise was observed in both rat and human skeletal muscle, as well as in the rat myocardium.<sup>22-24</sup>

A similar effect was found by Dobrzyn et al<sup>25</sup> in rat hindlimb muscles in response to 10 minutes of electrical stimulation of the sciatic nerve. The above observation indicates that accumulation of sphingosine is induced by muscle contractile activity rather than systemic changes related to exercise. This effect may result from enhanced ceramide hydrolysis, as alkaline and neutral ceramidases were found to be activated in rat skeletal muscles in response to a 30-minutes exercise. However, ceramidase activity decreased back to the baseline level after 90 minutes of exercise, and subsequently dropped below this level at the point of exhaustion.<sup>22</sup> Therefore, in the case of a more prolonged exercise other metabolic pathways (eg, decreased activity of ceramide synthase) must contribute to sphingosine accumulation. Bergman et al<sup>24</sup> found increased mRNA levels of alkaline ceramidase and SphK1 in human muscle biopsies taken immediately after exercise, and following 2 hours-recovery. This observation further supports the notion that exercise acutely stimulates ceramide degradation to sphingosine, and its subsequent conversion to SIP in skeletal muscle (Figure 2).

## 2.2 | Blood

Similarly to skeletal muscle, metabolism of circulating SIP was also found to be affected by acute exercise. In our first report we employed a cycle ergometer exercise at 70% of  $VO_2$  max performed by untrained subjects, and athletes for 30 minutes, and 60 minutes, respectively. In untrained individuals, plasma SIP concentration remained stable after 30 minutes of exercise. A significant increase in both SIP and dhSIP level was, however, observed following 30 minutes of recovery. In the case of athletes, there were no significant changes in the plasma concentration of measured

**FIGURE 2** Mechanism of exercise-induced increase in sphingosine-1-phosphate content in skeletal muscle and plasma. ApoM, apolipoprotein M; Cer, ceramide; Al/CDase, alkaline ceramidase; Al/Neut CDase, alkaline/neutral ceramidase; HDL, high-density lipoprotein; SIP, sphingosine-1-phosphate; Sph, sphingosine; SphK, sphingosine kinase





sphingolipids either during or after exercise.<sup>26</sup> Similarly to our results, Liu et al<sup>27</sup> also did not find statistically significant changes in SIP level during 3 hours of exercise on a cycle ergometer at 50% of  $\text{VO}_2$  max. Unfortunately, they did not investigate the subjects during the recovery phase. In another study, done on athletes, obese individuals, and patients with type 2 diabetes, serum SIP concentration remained stable during 90-minutes exercise on a cycle ergometer at 50% of  $\text{VO}_2$  max, but tended to decrease in untrained subjects following 2 hours of recovery.<sup>28</sup> It should be noted, however, that serum SIP level is 2- to 3-fold higher compared to plasma, which is a consequence of ongoing SIP release from erythrocytes, as well as its export from platelets activated during blood clotting.<sup>29,30</sup> Therefore, changes in serum SIP concentration may not reflect these in the plasma.

In a successive study, done on athletes, we used two types of rowing ergometer exercise: 60 minutes at 65% of  $\text{VO}_2$  max, and graded exercise until exhaustion. In the case of the former effort, plasma SIP level remained stable both during exercise and recovery. On the other hand, the concentration of dhSIP increased after 60 minutes of exercise, and remained at similar level following 30 minutes of recovery. However, 24 hours later dhSIP concentration decreased back to the basal value. Interestingly, graded exercise until exhaustion, despite much shorter duration (18-21 minutes), increased the plasma concentration of both SIP and dhSIP.<sup>21</sup> The results of the above studies indicate that the effect of acute exercise on plasma SIP metabolism depends on the training status. In untrained subjects a moderate intensity exercise is sufficient to increase SIP concentration in the plasma, whereas in athletes a much higher intensity is required to produce a similar effect.

Exercise-induced increase in plasma dhSIP concentration seems to result from its enhanced production and release in erythrocytes. In both of our studies, a progressive increase in dihydrosphingosine and dhSIP content in RBCs was observed during exercise, and this trend was maintained throughout the first 30 minutes of recovery.<sup>21,26</sup> Interestingly, electrically induced tachycardia was also found to increase dihydrosphingosine and dhSIP concentration in the plasma.<sup>31</sup> This effect was associated with elevated dihydrosphingosine content in the right ventricle, suggesting that the heart may contribute to exercise-induced increase in plasma dhSIP level by providing the substrate for its synthesis in blood cells.

The mechanism underlying the effect of exercise on plasma SIP level is likely more complex. Nevertheless, our data indicate that enhanced availability of sphingosine for SIP synthesis in blood cells is involved in this phenomenon (Figure 2). In untrained subjects, the increase in plasma SIP concentration during the recovery phase was associated with decreased ceramide content in erythrocytes. Xu et al<sup>32</sup>

detected alkaline ceramidase activity in human RBCs and found that this enzyme provides sphingosine required for SIP synthesis in erythrocytes. In athletes ceramide level in RBCs remained stable, however, the increase in their plasma SIP level, observed in response to high-intensity exercise, was accompanied by elevated sphingosine concentration in the plasma. In this case, sphingosine most likely originated from skeletal muscle. In the experiment involving one leg knee extension exercise, where arteriovenous difference in sphingolipid concentration was measured, we found that sphingosine was released across the leg when the highest workload was used.<sup>21</sup> Interestingly, a similar effect was observed in the resting leg which suggests involvement of systemic factors related to exercise in this phenomenon.

As already mentioned in the introduction, vascular endothelium represents an important source of circulating SIP. It was shown that ECs both export and degrade extracellular SIP.<sup>10</sup> We found that exercise markedly affects SIP metabolism in muscle circulation. At rest SIP is released across the leg in both rats and humans.<sup>21,33</sup> On the contrary, during exercise SIP uptake/degradation prevails in muscle circulation, and this effect augments in proportion to exercise intensity.<sup>21</sup> The alteration in SIP dynamics across the leg is, however, transient and disappears within the first 30 minutes following cessation of exercise, which explains why the increase in plasma SIP concentration develops during recovery. Interestingly, we also observed elevated SIP level in the arterial plasma in response to one leg knee extension exercise, whereas its concentration in the venous plasma remained fairly stable.<sup>21</sup> This observation indicates that exercise affects SIP metabolism in other parts of the circulation as well. The most likely candidates are pulmonary and hepatic vascular beds which are the major sites of degradation and release of circulating SIP.<sup>33</sup>

In contrast to exercise of a typical duration, ultra-endurance effort induces a profound decrease in plasma SIP concentration. In athletes participating in a 48 hours ultramarathon race, SIP and dhSIP levels in the plasma were markedly reduced after 24 hours of running, and further decrease, down to ~50% of the baseline value, took place at the end of the race. Importantly, this effect persisted throughout 48 hours of recovery.<sup>34</sup> Erythrocyte hemolysis and plasma volume expansion could not represent the major mechanisms underlying this effect. RBC count and hematocrit remained stable during the race, and a moderate decrease in these parameters was observed only in the recovery phase. The ultra-endurance effort was, however, associated with muscle injury and inflammatory response, as evidenced by markedly elevated C-reactive protein and creatine kinase levels.<sup>34</sup> It is well established that strong activation of inflammatory pathways results in a profound reduction in plasma SIP concentration. Such effect was observed in patients with sepsis, acute pancreatitis, and dengue

infection, as well as following lipopolysaccharide administration to mice.<sup>35-38</sup> It is, therefore, possible that activation of the inflammatory response contributes to decreased SIP level during ultra-endurance effort.

### 3 | EFFECT OF TRAINING ON SIP METABOLISM

#### 3.1 | Skeletal muscle

The first report on the effect of endurance training on skeletal muscle SIP metabolism was published by Błachnio-Zabielska et al.<sup>39</sup> They found that the content of both SIP and sphingosine in the soleus, as well as in the red and white portion of the gastrocnemius muscle, remained stable in rats subjected to 5 weeks of training on a treadmill. DhSIP level was, however, markedly increased in both portions of the gastrocnemius muscle. This effect was a consequence of increased availability of dihydrosphingosine resulting from enhanced de novo sphingolipid synthesis, as evidenced by striking increase in serine palmitoyltransferase activity. Similarly to rats, SIP level in the vastus lateralis of obese subjects was not affected by 16 weeks of regular aerobic exercise.<sup>40</sup> Consistently, Bergman et al.<sup>24</sup> did not find statistically significant differences in muscle SIP content between endurance trained athletes, and obese or type 2 diabetic subjects. Interestingly, muscle mRNA expression of alkaline ceramidase and SphK2 was higher in athletes, compared to the two remaining sedentary groups. In addition, S1PR<sub>1-3</sub> mRNA level was found to be markedly increased in rat soleus and flexor hallucis longus muscle following 8 weeks of resistance training.<sup>41</sup>

Taking together, during endurance training the acute increase in muscle SIP content induced by exercise does not translate into higher basal level of this sphingolipid. Nevertheless, SIP signaling in skeletal muscle may still be enhanced by training thanks to higher S1PR expression.

#### 3.2 | Blood

In 2011 we found for the first time that resting plasma SIP (but not dhSIP) concentration is higher in endurance trained athletes compared to untrained subjects.<sup>26</sup> We confirmed this finding in the subsequent study, where participants were subjected to 8 weeks of endurance training on a rowing ergometer. Interestingly, plasma fractionation showed that the increase in total SIP concentration resulted entirely from elevation in the amount of the HDL-bound pool.<sup>42</sup> Higher total plasma SIP level was observed also in both pre- and post-menopausal women following 3 months of high-intensity interval training on a cycleergometer.<sup>43</sup>

It should be noted, however, that Bergman et al.<sup>28</sup> did not find statistically significant differences in serum SIP concentration between endurance trained athletes, and obese or type 2 diabetic subjects. Nevertheless, as it was previously mentioned, changes occurring in plasma SIP level may be masked by SIP release from blood cells if serum is analyzed.

The effect of resistance training on plasma SIP concentration remains unclear. Jorgensen et al.<sup>44</sup> found no change in SIP level in patients with multiple sclerosis subjected to 24 weeks of high-intensity resistance training. On the other hand, plasma SIP concentration was markedly increased in rats following 8 weeks of training on a resistance ladder.<sup>41</sup>

We found that the increase in plasma SIP level induced by endurance training is associated with enhanced SphK activity in both erythrocytes and platelets, and augmented SIP release from RBCs.<sup>42</sup> In addition, the content of ceramide in erythrocytes of athletes was found to be lower compared to untrained subjects, suggesting that training may stimulate ceramidase activity in these blood cells to provide more substrate for SIP synthesis<sup>26</sup> (Figure 2). In the study done on pre- and post-menopausal women, the increase in plasma SIP level was associated with elevated ApoM concentration.<sup>43</sup> This observation indicates that enhanced availability of the major SIP carrier may also represent a mechanism underlying the effect of training on plasma SIP level. However, in our study ApoM concentration remained stable.<sup>42</sup>

### 4 | IMPLICATIONS FOR EXERCISE PHYSIOLOGY

#### 4.1 | Muscle fatigue

There is an increasing body of evidence that alterations in SIP metabolism produced by acute exercise may induce a significant effect on muscle contractile function. Danielli-Betto et al.<sup>45</sup> found that exogenous administration of SIP or sphingosine markedly reduces fatigue development in murine extensor digitorum longus (EDL) muscle. Importantly, sphingosine was able to reduce fatigue only after conversion to SIP by SphK. The effect of SIP seems to be mediated by S1PR<sub>3</sub>, as EDL of mice lacking this receptor is characterized by lower twitch tension amplitude, faster fatigue development, and slower recovery.<sup>46</sup> It should be noted, however, that exogenous SIP was still able to reduce muscle fatigue development in these mice, which suggests that S1PR<sub>3</sub> is not the only S1PR subtype involved in this phenomenon.<sup>46</sup> The anti-fatigue properties of SIP seem to be related to its positive effect on muscle excitation-contraction coupling and action potential amplitude.<sup>45,47</sup>

On the contrary, sphingosine was found to inhibit calcium release from the sarcoplasmic reticulum in skinned rabbit skeletal muscle fibers and cardiomyocytes, as well as in murine skeletal muscle, by direct interaction with the ryanodine receptor.<sup>45,48,49</sup> Exercise-induced accumulation of sphingosine was, therefore, proposed to contribute to the development of muscle fatigue.<sup>45</sup> Considering the opposite effects of SIP and sphingosine on excitation-contraction coupling, maintaining a proper balance between these two sphingolipids is likely important for normal contractile function of skeletal muscle. Enhanced conversion of sphingosine to SIP in muscle cells, in combination with increased availability of extracellular SIP, during exercise may, therefore, represent a mechanism preventing premature muscle fatigue.

#### 4.2 | Peripheral edema

Decreased availability of plasma SIP may contribute to some detrimental effects of ultra-endurance exercise. Circulating SIP was found to be an important regulator of endothelial barrier function. Experiments on mice showed that selective lack of SIP in plasma, as well as impaired S1PR<sub>1</sub> signaling, are associated with increased basal and inflammation-induced vascular leak.<sup>50,51</sup> Peripheral edema is frequently found in athletes completing an ultramarathon run,<sup>52</sup> and impaired endothelial barrier function resulting from reduced plasma SIP level may contribute to this effect.

#### 4.3 | Possible role of dhSIP

The results of our studies show that acute exercise induces a stronger effect on plasma dhSIP level, compared to SIP.<sup>21,26,34</sup> Moreover, we found that in skeletal muscle dhSIP (but not SIP) content is increased by endurance training.<sup>39</sup> Although the biological activity of dhSIP is poorly studied, it is commonly thought to exert effects similar to SIP, since it activates S1PRs with equivalent potency.<sup>53</sup> The available data, however, indicates that dhSIP is not a mere analog of SIP. These two sphingolipids show different distribution in plasma fractions and transport protein preferences.<sup>54</sup> Moreover, in some studies they were even found to induce opposite effects.<sup>55,56</sup> It is, therefore, possible that dhSIP possesses unique, yet unexplored, functions in exercise physiology.

#### 4.4 | Satellite cells

Satellite cells (SCs) constitute a skeletal muscle-specific population of stem cells that plays a crucial role in muscle fiber

maintenance, repair and remodeling. SCs are activated by exercise and contribute to muscle adaptation to training.<sup>57</sup> In recent years, SIP was found to be a potent activator of SCs.<sup>58</sup> Calise et al.<sup>59</sup> showed that SIP stimulates SCs proliferation, migration, maturation, and formation of new myofibers. It strongly indicates that SIP participates in skeletal muscle regeneration.

Studies done on mdx mice, a model of muscular dystrophy, have shown that inhibition of S1PL or external administration of SIP prevents reduction in muscle mass, while inactivation of this lipid accelerates muscle atrophy.<sup>60,61</sup> Furthermore, inhibition of SphK activity markedly limited the response of SCs to mitogen, and impaired the movement of these cells to the muscle injured by cardiotoxin.<sup>58</sup> Increased level of SIP and enhanced SphK1 activity was also observed in damaged muscle fibers, and in SCs associated with them.<sup>62</sup> Moreover, it was shown that external administration of SIP caused myofibers to regenerate.<sup>63</sup>

S1PR<sub>1</sub> and S1PR<sub>3</sub> are expressed in quiescent SCs. Although S1PR<sub>2</sub> was absent on these cells, it seems to be largely responsible for the early phase of regeneration.<sup>64-66</sup> Danieli-Betto et al.<sup>63</sup> reported upregulated expression of S1P<sub>2</sub> during the initial regeneration phase of soleus muscle damaged by bupivacaine. In addition, there was an overexpression of S1PR<sub>1</sub>, whereas S1PR<sub>3</sub> expression was markedly reduced. In light of these results, Fortier et al.<sup>67</sup> noticed that lack of S1PR<sub>3</sub> stimulated proliferation of SCs, and induced acute, and chronic muscle regeneration. However, overexpression of this receptor had the opposite effect. The principal role of S1PR<sub>2</sub> in the initial phase of regeneration was confirmed by Germinario et al.,<sup>66</sup> who found impaired muscle regeneration in both S1PR<sub>2</sub>-null mice, and in animals administrated with S1PR<sub>2</sub> antagonist. Attempts to administrate SIP externally, or to restore its function using a specific antibody, failed to stimulate recovery in these animals. Consistently, the lack of S1PR<sub>2</sub> activity completely inhibited the pro-myogenic functions of SCs, which was manifested by deficiency of key markers of muscle differentiation and growth.

Calise et al.<sup>59</sup> pointed out that SIP/S1PR<sub>1,3</sub> axis can act on SCs in two ways. On the one hand, SCs may be stimulated and receive mitogenic signaling, but on the other, this axis is able to inhibit the myogenic effect. As a result, proliferation is stopped and differentiation into myoblasts begins.

#### 4.5 | Mitochondrial function

SIP also emerges as a regulator of mitochondrial function. Several studies found that normal activity of SphK2, which is predominantly localized at intracellular membranes, including mitochondria,<sup>68</sup> is important for the proper

function of these organelles. Inhibition of SphK2 resulted in mitochondrial dysfunction and reduced ATP synthesis in dopaminergic nerve precursor cell line, murine cardiomyocytes, HeLa cells, and insulinoma 6 cells.<sup>68-70</sup> Strub et al<sup>68</sup> found that the effect of S1P is mediated by its direct interaction with prohibitin 2, a highly conserved protein that regulates mitochondrial assembly and function. Interestingly, administration of extracellular S1P was able to restore normal mitochondrial function in SphK2 knock-down cells.<sup>69,70</sup> In addition, incubation of C2C12 cells with either S1PL inhibitor or S1P was showed to markedly enhance maximal mitochondrial respiration rate. This effect resulted from increased capacity to oxidize fatty acids, which was further supported by upregulated expression of fatty acid metabolism genes in response to treatment with S1PL inhibitor.<sup>61</sup> Extracellular S1P (via binding to S1PR<sub>2</sub>) was also found to promote mitochondrial biogenesis in Hep G2 cells by activating peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$ .<sup>71</sup> Recently, Fang et al<sup>72</sup> reported that extracellular S1P reduces mitochondrial oxidative stress induced by high concentration of insulin in normal human hepatic cell line LO2. A study on *C elegans* revealed that S1P is also crucial for activation of the mitochondrial unfolded protein response that maintains mitochondrial protein homeostasis upon stress. The mechanism underlying this phenomenon involves rapid, reversible translocation of SphK1 to mitochondrial membranes and subsequent S1P production.<sup>73</sup>

## 5 | S1P AS A MEDIATOR OF THE EFFECT OF EXERCISE ON CARDIOVASCULAR HEALTH

The benefits of aerobic exercise in the prevention and therapy of cardiovascular disease are firmly established.<sup>74</sup> In this section, we discuss the evidence supporting the hypothesis that the increase in S1P levels (especially in the HDL-bound pool in the plasma) represents one of the mechanisms mediating the positive influence of regular physical activity on cardiovascular health.

There is a host of evidence for the beneficial role of HDL-bound S1P in cardiovascular disease. It was found to exert strong protection against ischemia/reperfusion injury of the heart, as well as to induce anti-atherogenic, and anti-inflammatory effects in the vascular system.<sup>18,19</sup> In addition, some other functions of HDL, such as vasodilation, angiogenesis, and promotion of the endothelial barrier function, are also mediated by its S1P cargo.<sup>75</sup> It was reported that HDL dysfunction observed in patients with coronary artery disease results from decreased S1P content. Importantly, this dysfunction can be effectively reversed by loading of HDL with S1P.<sup>76</sup>

In recent years S1PRs emerged as potential new targets for the anti-hypertensive therapy. Initially, intravenous administration of S1P was shown to rapidly decrease arterial blood pressure in rats.<sup>77</sup> S1P bound to HDL is also responsible, at least in part, for a similar decrease in blood pressure following intra-arterial injection of HDL.<sup>78</sup> Subsequent studies found that activation of S1PR<sub>1</sub> and S1PR<sub>3</sub> in vascular endothelial cells results in vasodilation mediated by enhanced nitric oxide production.<sup>79</sup> Administration of SEW2871, an S1PR<sub>1</sub> agonist, was reported to markedly decrease blood pressure in hypertensive mice.<sup>80</sup> On the other hand, chronic treatment with Fingolimod (FTY720), a drug that is considered to be a functional S1PR<sub>1</sub> antagonist, increased blood pressure in both rats and humans.<sup>81,82</sup> The anti-hypertensive properties of S1P may be also related to its effect on urinary sodium excretion. Activation of S1PR<sub>1</sub> in the renal medulla was shown to markedly stimulate natriuresis and medullary blood flow.<sup>83</sup>

Obesity is an independent risk factor for cardiovascular disease, and exercise is one of the therapeutic interventions for the prevention and management of excessive weight. It was shown that in overweight and obese individuals the effect of exercise on energy balance, in addition to increased energy expenditure, is mediated also by suppression of appetite.<sup>84</sup> Silva et al<sup>85</sup> revealed the key role of hypothalamic S1PR<sub>1</sub> in the regulation of energy balance in rodents. They found that intracerebroventricular injection of S1P reduces food consumption and increases energy expenditure, whereas the selective disruption of hypothalamic S1PR<sub>1</sub> results in increased food intake. In the subsequent study by the same group, chronic exercise reversed the downregulated expression of S1PR<sub>1</sub> observed in the hypothalamus of middle-aged mice, restoring the anorexigenic and thermogenic signals. Moreover, acute exercise increased S1P concentration in the cerebrospinal fluid of young rats, and injection of this fluid into the hypothalamus of middle-aged rats at rest was sufficient to reduce the food intake.<sup>86</sup>

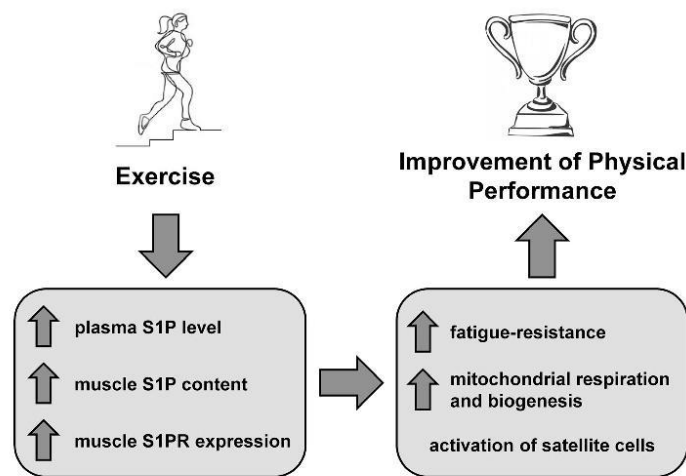
## 6 | CONCLUDING REMARKS AND FUTURE PERSPECTIVES

Studies conducted over the last decade clearly showed that exercise induces a strong effect on S1P metabolism, and elevates the level of this bioactive sphingolipid in muscle, plasma, and cerebrospinal fluid (Table 1). S1P was found to regulate several aspects of muscle biology, including excitation-contraction coupling, satellite cell activity, and mitochondrial function. Taking together, the available data strongly suggest that enhanced S1P signaling may play a significant role in adaptation of skeletal muscle to exercise (Figure 3). Direct experimental evidence supporting this hypothesis is,

**TABLE 1** Summary of studies investigating the effect of acute exercise or training on S1P level

Reference	Tissue	Exercise modality	Effect on S1P level
<b>Acute exercise</b>			
Silva et al (2016) <sup>86</sup>	Rat cerebrospinal fluid	Swimming, 3 h	↑↑↑
Baranowski et al (2008) <sup>23</sup>	Rat left ventricle	Treadmill (1200 m/h, +10° incline)	↔
		30 min exercise	↔
		90 min exercise	↔
Błachnio-Zabielska et al (2008) <sup>22</sup>	Rat skeletal muscle	Treadmill (1200 m/h, +10° incline)	↔
		30 min	↔
		90 min	↑↑
		Exhaustion	
Baranowski et al (2015) <sup>21</sup>	Human skeletal muscle	One-leg knee extension exercise (untrained subjects)	↔
		30 min at 25% of W	↑↑
		30 min at 55% of W <sub>max</sub>	↑
		120 min at 55% of W <sub>max</sub>	
		30 min at 85% of W <sub>max</sub>	
Bergman et al (2016) <sup>24</sup>	Human skeletal muscle	Cycle ergometer 90 min at 50% VO <sub>2</sub> max	↑
Baranowski et al (2014) <sup>34</sup>	Human plasma	48 h ultramarathon run (athletes)	↓↓
Baranowski et al (2015) <sup>21</sup>	Human plasma	Rowing ergometer (athletes)	↔
		30 min at 65% of VO <sub>2</sub> max	↔
		60 min at 65% of VO <sub>2</sub> max graded exercise until exhaustion	↑
Baranowski et al (2011) <sup>26</sup>	Human plasma	Cycle ergometer	↑
		30 min at 70% of VO <sub>2</sub> max (untrained subjects)	↔
		30 min at 70% of VO <sub>2</sub> max (athletes)	↔
		60 min at 70% of VO <sub>2</sub> max (athletes)	
Liu et al (2018) <sup>27</sup>	Human plasma	Cycle ergometer	↔
		1 h at 50% of VO <sub>2</sub> max	↔
		2 h at 50% of VO <sub>2</sub> max	↔
		3 h at 50% of VO <sub>2</sub> max	
Bergman et al (2015) <sup>28</sup>	Human serum	Cycle ergometer	↔
		90 min at 50% of VO <sub>2</sub> max (untrained subjects)	↔
		90 min at 50% of VO <sub>2</sub> max (athletes)	
<b>Endurance training</b>			
Błachnio-Zabielska et al (2011) <sup>39</sup>	Rat skeletal muscle	Treadmill 5 wk	↔
Dubé et al (2011) <sup>40</sup>	Human skeletal muscle	Cycle ergometer and walking 6 wk	↔
Książek et al (2018) <sup>42</sup>	Human plasma	Rowing ergometer 8 wk	↑
Yafasova et al (2019) <sup>43</sup>	Human plasma	Cycle ergometer 3 mo	↑
<b>Resistance training</b>			
Banitalebi et al (2013) <sup>41</sup>	Rat plasma	Resistance ladder 8 wk	↑↑
Jørgensen et al (2019) <sup>44</sup>	Human plasma	Upper and lower body exercises 24 wk	↔

**FIGURE 3** Sphingosine-1-phosphate as a mediator of skeletal muscle adaptation to exercise. S1P, sphingosine-1-phosphate; S1PR, sphingosine-1-phosphate receptor



however, still lacking. Therefore, future research in this area should employ *in vivo* gain- and loss of function models of S1P production and signaling. In addition, the physiological role of dhS1P in skeletal muscle remains to be characterized. The training-induced increase in HDL-bound S1P level may also represent one of the mechanisms responsible for the positive effect of exercise on cardiovascular risk.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The study was supported by the National Science Centre, Poland (grant no. 2018/31/B/NZ7/02543), and by the Medical University of Białystok (grant no. SUB/1/DN/20/001/1118).

#### ORCID

Marcin Baranowski  <https://orcid.org/0000-0002-3714-5815>

#### REFERENCES

- Yang J, Yu Y, Sun S, Duerksen-Hughes PJ. Ceramide and other sphingolipids in cellular responses. *Cell Biochem Biophys*. 2004;40:323-350.
- Maceyka M, Harikumar KB, Milstien S, Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate signaling and its role in disease. *Trends Cell Biol*. 2012;22:50-60.
- Takabe K, Paugh SW, Milstien S, Spiegel S. Inside-out signaling of sphingosine-1-phosphate: Therapeutic targets. *Pharmacol Rev*. 2008;60:181-195.
- Strub GM, Maceyka M, Hait NC, Milstien S, Spiegel S. Extracellular and intracellular actions of sphingosine-1-phosphate. *Adv Exp Med Biol*. 2010;688:141-155.
- Hannun YA, Obeid LM. Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19:175-191.
- Sanllehi P, Abad JL, Casas J, Delgado A. Inhibitors of sphingosine-1-phosphate metabolism (sphingosine kinases and sphingosine-1-phosphate lyase). *Chem Phys Lipids*. 2016;197:69-81.
- Kai M, Sakane F, Jia YJ, Imai SI, Yasuda S, Kanoh H. Lipid phosphate phosphatases 1 and 3 are localized in distinct lipid rafts. *J Biochem*. 2006;140:677-686.
- Okajima F. Plasma lipoproteins behave as carriers of extracellular sphingosine 1-phosphate: Is this an atherogenic mediator or an anti-atherogenic mediator? *Biochim Biophys Acta*. 2002;1582:132-137.
- Christoffersen C, Obinata H, Kumaraswamy SB, et al. Endothelium-protective sphingosine-1-phosphate provided by HDL-associated apolipoprotein M. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108:9613-9618.
- Książek M, Chacińska M, Chabowski A, Baranowski M. Sources, metabolism, and regulation of circulating sphingosine-1-phosphate. *J Lipid Res*. 2015;56:1271-1281.
- Pappu R, Schwab SR, Cornelissen I, et al. Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate. *Science*. 2007;316:295-298.
- Xiong Y, Yang P, Proia RL, Hla T. Erythrocyte-derived sphingosine 1-phosphate is essential for vascular development. *J Clin Invest*. 2014;124:4823-4828.
- Vu TM, Ishizu AN, Foo JC, et al. Mfsd2b is essential for the sphingosine-1-phosphate export in erythrocytes and platelets. *Nature*. 2017;550:524-528.
- Hisano Y, Kobayashi N, Yamaguchi A, Nishi T. Mouse SPNS2 Functions as a sphingosine-1-phosphate transporter in vascular endothelial cells. *PLoS One*. 2012;7:e38941.
- Kharel Y, Huang T, Salamon A, Harris TE, Santos WL, Kevin R. Mechanism of sphingosine 1-phosphate clearance from blood. *Biochem J*. 2020;477:925-935.
- Ishii M, Kikuta J. Sphingosine-1-phosphate signaling controlling osteoclasts and bone homeostasis. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1831:223-227.
- Thuy AV, Reimann CM, Hemdan NYA, Gräler MH. Sphingosine 1-phosphate in blood: Function, metabolism, and fate. *Cell Physiol Biochem*. 2014;34:158-171.
- Karliner JS. Sphingosine kinase and sphingosine 1-phosphate in the heart: A decade of progress. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1831:203-212.

19. Poñ F, Simoni M, Nofer JR. Atheroprotective role of high-density lipoprotein (HDL)-associated sphingosine-1-phosphate (S1P). *Cardiovasc Res*. 2014;103:395-404.
20. Cordeiro AV, Silva VRR, Pauli JR, et al. The role of sphingosine-1-phosphate in skeletal muscle: Physiology, mechanisms, and clinical perspectives. *J Cell Physiol*. 2019;234:10047-10059.
21. Baranowski M, Błachnio-Zabielska AU, Charmas M, et al. Exercise increases sphingoid base-1-phosphate levels in human blood and skeletal muscle in a time- and intensity-dependent manner. *Eur J Appl Physiol*. 2015;115:993-1003.
22. Błachnio-Zabielska A, Baranowski M, Zabielski P, Górski J. Effect of exercise duration on the key pathways of ceramide metabolism in rat skeletal muscles. *J Cell Biochem*. 2008;105:776-784.
23. Baranowski M, Zabielski P, Błachnio A, Górski J. Effect of exercise duration on ceramide metabolism in the rat heart. *Acta Physiol*. 2008;192:519-529.
24. Bergman BC, Brozinick JT, Strauss A, et al. Muscle sphingolipids during rest and exercise: a C18:0 signature for insulin resistance in humans. *Diabetologia*. 2016;59:785-798.
25. Dobrzyñ A, Górski J. Effect of acute exercise on the content of free sphinganine and sphingosine in different skeletal muscle types of the rat. *Horm Metab Res*. 2002;34:523-529.
26. Baranowski M, Charmas M, Górski J. Exercise increases plasma levels of sphingoid base-1 phosphates in humans. *Acta Physiol*. 2011;203:373-380.
27. Liu X, Hoene M, Yin P, et al. Quality control of serum and plasma by quantification of (4E,14Z)-sphingadine-C18-1-phosphate uncovers common preanalytical errors during handling of whole blood. *Clin Chem*. 2018;64:810-819.
28. Bergman BC, Brozinick JT, Strauss A, et al. Serum sphingolipids: Relationships to insulin sensitivity and changes with exercise in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2015;309:398-408.
29. Caligan TB, Peters K, Ou J, Wang E, Saba J, Merrill AH. A high-performance liquid chromatographic method to measure sphingosine 1-phosphate and related compounds from sphingosine kinase assays and other biological samples. *Anal Biochem*. 2000;281:36-44.
30. Murata N, Sato K, Kon J, et al. Interaction of sphingosine 1-phosphate with plasma components, including lipoproteins, regulates the lipid receptor-mediated actions. *Biochem J*. 2000;352:809-815.
31. Wojcik B, Baranowski M, Chabowski A, Gorski J. Effect of atrial pacing on the level of bioactive sphingolipids in the heart ventricles of the rat. *J Physiol Pharmacol*. 2015;241:72-148.
32. Xu R, Sun W, Jin J, Obeid LM, Mao C, Sp P. Role of alkaline ceramidases in the generation of sphingosine and its phosphate in erythrocytes. *FASEB J*. 2010;24:2507-2515.
33. Książek M, Baranowska U, Chabowski A, Baranowski M. Arteriovenous Sphingosine-1-Phosphate Differences Across Selected Organs of the Rat. *Cell Physiol Biochem*. 2018;45:67-77.
34. Baranowski M, Górski J, Klapcinska B, Waskiewicz Z, Sadowska-Krepa E. Ultramarathon run markedly reduces plasma sphingosine-1-phosphate concentration. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*. 2014;24:148-156.
35. Gomes L, Fernando S, Fernando RH, et al. Sphingosine 1-phosphate in acute dengue infection. *PLoS One*. 2014;9:113394.
36. Konoñczuk T, Łukaszuk B, Żendzian-Piotrowska M, et al. Plasma sphingolipids in acute pancreatitis. *Int J Mol Sci*. 2017;18:2606.
37. Coldewey SM, Benetti E, Collino M, et al. Elevation of serum sphingosine-1-phosphate attenuates impaired cardiac function in experimental sepsis. *Sci Rep*. 2016;6:1-12.
38. Dong A, Sunkara M, Panchatcharam M, et al. Synergistic effect of anemia and red blood cells transfusion on inflammation and lung injury. *Adv Hematol*. 2012;2:924042.
39. Błachnio-Zabielska A, Zabielski P, Baranowski M, Gorski J. Aerobic training in rats increases skeletal muscle sphingomyelinase and serine palmitoyltransferase activity, while decreasing ceramidase activity. *Lipids*. 2011;46:229-238.
40. Dubé JJ, Amati F, Toledo FGS, et al. Effects of weight loss and exercise on insulin resistance, and intramyocellular triacylglycerol, diacylglycerol and ceramide. *Diabetologia*. 2011;54:1147-1156.
41. Banitalebi E, Gharakhanlou R, Parnow A, Teimori H. The study of effect of resistance training on plasma S1P level and gene expression of S1P1, 2, 3 receptors in male Wistar rat. *Minerva Endocrinol*. 2013;38:395-400.
42. Książek M, Charmas M, Klusiewicz A, et al. Endurance training selectively increases high-density lipoprotein-bound sphingosine-1-phosphate in the plasma. *Scand J Med Sci Sport*. 2018;28:57-64.
43. Yafasova A, Mandrup CM, Egelund J, et al. Effect of menopause and exercise training on plasma apolipoprotein M and sphingosine-1-phosphate. *J Appl Physiol*. 2019;126:214-220.
44. Jørgensen MLK, Kjølhede T, Dalgas U, Hvid LG. Plasma brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and sphingosine-1-phosphate (S1P) are not the main mediators of neuroprotection induced by resistance training in persons with multiple sclerosis - A randomized controlled trial. *Mult Scler Relat Disord*. 2019;31:106-111.
45. Danieli-Betto D, Germinario E, Esposito A, et al. Sphingosine 1-phosphate protects mouse extensor digitorum longus skeletal muscle during fatigue. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005;288:1367-1373.
46. Germinario E, Bondi M, Cencetti F, et al. S1P3 receptor influences key physiological properties of fast-twitch extensor digitorum longus muscle. *J Appl Physiol*. 2016;120:1288-1300.
47. Bencini C, Squecco R, Piperio C, et al. Effects of sphingosine 1-phosphate on excitation-contraction coupling in mammalian skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil*. 2003;24:539-554.
48. Sabbadini RA, Betto R, Teresi A, Fachechi-Cassano G, Salvati G. The effects of sphingosine on sarcoplasmic reticulum membrane calcium release. *J Biol Chem*. 1992;267:15475-15484.
49. Webster RJ, Sabbadini RA, Dettbarn CA, Paolini PJ. Sphingosine effects on the contractile behavior of skinned cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 1994;26:1273-1290.
50. Camerer E, Pappu R, Coughlin SR, et al. Sphingosine-1-phosphate in the plasma compartment regulates basal and inflammation-induced vascular leak in mice. *J Clin Invest*. 2009;119:1871-1879.
51. Oo ML, Han DK, Hla T, et al. Engagement of S1P1-degradative mechanisms leads to vascular leak in mice. *J Clin Invest*. 2011;121:2290-2300.
52. Bracher A, Knechtle B, Gnadinger M, et al. Fluid intake and changes in limb volumes in male ultra-marathoners: does fluid overload lead to peripheral oedema? *Eur J Appl Physiol*. 2012;112:991-1003.
53. Van Brocklyn JR, Lee MJ, Menzeleev R, et al. Dual actions of sphingosine-1-phosphate: Extracellular through the Gi-coupled receptor Edg-1 and intracellular to regulate proliferation and survival. *J Cell Biol*. 1998;142:229-240.

54. Mishima Y, Kurano M, Kobayashi T, et al. Dihydro-sphingosine 1-phosphate interacts with carrier proteins in a manner distinct from that of sphingosine 1-phosphate. *Biosci Rep*. 2018;38:1-11.
55. Bu S, Kapanadze B, Hsu T, Trojanowska M. Opposite effects of dihydro-sphingosine 1-phosphate and sphingosine 1-phosphate on transforming growth factor- $\beta$ /Smad signaling are mediated through the PTEN/PPM1A-dependent pathway. *J Biol Chem*. 2008;283:19593-19602.
56. Magaye RR, Savira F, Hua Y, et al. Exogenous dihydro-sphingosine 1-phosphate mediates collagen synthesis in cardiac fibroblasts through JAK/STAT signalling and regulation of TIMP1. *Cell Signal*. 2020;72:109629.
57. Bazgir B, Fathi R, Valojerdi MR, Mozdziaik P, Asgari A. Satellite cells contribution to exercise mediated muscle hypertrophy and repair. *Cell J*. 2017;18:473-484.
58. Nagata Y, Partridge TA, Matsuda R, Zammit PS. Entry of muscle satellite cells into the cell cycle requires sphingolipid signaling. *J Cell Biol*. 2006;174:245-253.
59. Calise S, Blescia S, Cencetti F, Bernacchioni C, Donati C, Bruni P. Sphingosine 1-phosphate stimulates proliferation and migration of satellite cells: role of S1P receptors. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1823:439-450.
60. Ieronimakis N, Pantoja M, Hays AL, et al. Increased sphingosine-1-phosphate improves muscle regeneration in acutely injured mdx mice. *Skelet Muscle*. 2013;3:20.
61. Nguyen-Tran DH, Hait NC, Sperber H, et al. Molecular mechanism of sphingosine-1-phosphate action in Duchenne muscular dystrophy. *Dis Model Mech*. 2014;7:41-54.
62. Sassoli C, Formigli L, Bini F, et al. Effects of S1P on skeletal muscle repair/regeneration during eccentric contraction. *J Cell Mol Med*. 2011;15:2498-2511.
63. Danieli-Betto D, Peron S, Germinario E, et al. Sphingosine 1-phosphate signaling is involved in skeletal muscle regeneration. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2010;298:550-558.
64. Adada M, Canals D, Hannun YA, Obeid LM. Sphingosine-1-phosphate receptor 2. *FEBS J*. 2013;280:6354-6366.
65. Loh KC, Leong WI, Carlson ME, et al. Sphingosine-1-phosphate enhances satellite cell activation in dystrophic muscles through a S1PR2/STAT3 signaling pathway. *PLoS One*. 2012;7:37218.
66. Germinario E, Peron S, Toniolo L, et al. S1P2 receptor promotes mouse skeletal muscle regeneration. *J Appl Physiol*. 2012;113:707-713.
67. Fortier M, Figeac N, White RB, Knopp P, Zammit PS. Sphingosine-1-phosphate receptor 3 influences cell cycle progression in muscle satellite cells. *Dev Biol*. 2013;382:504-516.
68. Strub GM, Paillard M, Liang J, et al. Sphingosine-1-phosphate produced by sphingosine kinase 2 in mitochondria interacts with prohibitin 2 to regulate complex IV assembly and respiration. *FASEB J*. 2011;25:600-612.
69. Hong SW, Lee J, Kwon H, et al. Deficiency of sphingosine-1-phosphate reduces the expression of prohibitin and causes  $\beta$ -Cell impairment via mitochondrial dysregulation. *Endocrinol Metab*. 2018;33:403-412.
70. Sivasubramanian M, Kanagaraj N, Dheen ST, Tay SSW. Sphingosine kinase 2 and sphingosine-1-phosphate promotes mitochondrial function in dopaminergic neurons of mouse model of Parkinson's disease and in MPP+ treated MN9D cells in vitro. *Neuroscience*. 2015;290:636-648.
71. Shen Z, Liu C, Liu P, Zhao J, Xu W. Sphingosine 1-phosphate (S1P) promotes mitochondrial biogenesis in Hep G2 cells by activating Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ). *Cell Stress Chaperones*. 2014;19:541-548.
72. Fang H, Feng Q, Shi Y, Zhou J, Wang Q, Zhong L. Hepatic insulin resistance induced by mitochondrial oxidative stress can be ameliorated by sphingosine 1-phosphate. *Mol Cell Endocrinol*. 2009;501:110660.
73. Kim S, Sieburth D. Sphingosine kinase activates the mitochondrial unfolded protein response and is targeted to mitochondria by stress. *Cell Rep*. 2018;24(2932-2945):e4.
74. Blair SN, Morris JN. Healthy hearts-and the universal benefits of being physically active: Physical activity and health. *Ann Epidemiol*. 2009;19:253-256.
75. Egom EE, Mamas MA, Soran H. HDL quality or cholesterol cargo: What really matters-Spotlight on sphingosine-1-phosphate-rich HDL. *Curr Opin Lipidol*. 2013;24:351-356.
76. Sattler K, Gräler M, Keul P, et al. Defects of high-density lipoproteins in coronary artery disease caused by low sphingosine-1-phosphate content. *J Am Coll Cardiol*. 2015;66:1470-1485.
77. Forrest M, Sun SY, Hajdu R, et al. Immune cell regulation and cardiovascular effects of sphingosine 1-phosphate receptor agonists in rodents are mediated via distinct receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004;309:758-768.
78. Nofer JR, Van Der Giet M, Tölle M, et al. HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3. *J Clin Invest*. 2004;113:569-581.
79. Cantalupo A, Di Lorenzo A. S1P signaling and de novo biosynthesis in blood pressure homeostasis. *J Pharmacol Exp Ther*. 2016;358:359-370.
80. Cantalupo A, Zhang Y, Kothiya M, et al. Nogo-B regulates endothelial sphingolipid homeostasis to control vascular function and blood pressure. *Physiol Behav*. 2015;21:1028-1037.
81. Tawadrous MN, Mabuchi A, Zimmermann A, Wheatley AM. Effects of immunosuppressant FTY720 on renal and hepatic hemodynamics in the rat. *Transplantation*. 2002;74:602-610.
82. Cohen JA, Barkhof F, Comi G, et al. Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2010;362:402-415.
83. Bischoff A, Heringdorf DMZ, Jakobs KH, Michel MC. Lysosphingolipid receptor-mediated diuresis and natriuresis in anaesthetized rats. *Br J Pharmacol*. 2001;132:1925-1933.
84. Schubert MM, Desbrow B, Sabapathy S, Leveritt M. Acute exercise and subsequent energy intake. *A meta-analysis. Appetite*. 2013;63:92-104.
85. Silva VRR, Micheletti TO, Pimentel GD, et al. Hypothalamic S1P/S1PR1 axis controls energy homeostasis. *Nat Commun*. 2014;5:4859.
86. Silva VRR, Katashima CK, Silva CGB, et al. Hypothalamic S1P/S1PR1 axis controls energy homeostasis in middle-aged rodents: The reversal effects of physical exercise. *Aging*. 2016;9:142-155.

**How to cite this article:** Hodun K, Chabowski A, Baranowski M. Sphingosine-1-phosphate in acute exercise and training. *Scand J Med Sci Sport*. 2021;31:945-955. <https://doi.org/10.1111/sms.13907>



## 9. Publikacja nr 2

Katarzyna Hodun, Miłosz Czuba, Kamila Płoszczyca, Jerzy Sadowski, Józef  
Langfort, Adrian Chabowski, Marcin Baranowski

The effect of normobaric hypoxia on acute exercise-induced changes in  
blood sphingoid base-1-phosphates metabolism in cyclists.

*Biology of Sport*

Artykuł zaakceptowany 17.08.2023

MEiN: 140. Impact factor: 5.6

## The effect of normobaric hypoxia on acute exercise-induced changes in blood sphingoid base-1-phosphates metabolism in cyclists

**AUTHORS:** Katarzyna Hodun<sup>1</sup>, Miłosz Czuba<sup>2</sup>, Kamila Płoszczyca<sup>3</sup>, Jerzy Sadowski<sup>4</sup>, Józef Langfort<sup>5</sup>, Adrian Chabowski<sup>1</sup>, Marcin Baranowski<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Physiology, Medical University of Białystok, Białystok, Poland

<sup>2</sup> Faculty of Rehabilitation, Józef Piłsudski University of Physical Education in Warsaw, Warsaw, Poland

<sup>3</sup> Department of Kinesiology, Institute of Sport – National Research Institute, Warsaw, Poland

<sup>4</sup> Faculty of Physical Education and Health, Józef Piłsudski University of Physical Education in Warsaw, Warsaw, Poland

<sup>5</sup> Department of Sports Theory, Jerzy Kukuczka Academy of Physical Education, Katowice, Poland

**ABSTRACT:** Extracellular sphingosine-1-phosphate (S1P) emerged as an important regulator of muscle function. We previously found that plasma S1P concentration is elevated in response to acute exercise and training. Interestingly, hypoxia, which is commonly utilized in training programs, induces a similar effect. Therefore, the aim of the current study was to determine the effect of normobaric hypoxia on exercise-induced changes in blood sphingolipid metabolism. Fifteen male competitive cyclists performed a graded cycling exercise until exhaustion (GE) and a simulated 30 km individual time trial (TT) in either normoxic or hypoxic (FIO<sub>2</sub> = 16.5%) conditions. Blood samples were taken before the exercise, following its cessation, and after 30 min of recovery. We found that TT increased dihydrosphingosine-1-phosphate (dhS1P) concentration in plasma (both HDL- and albumin-bound) and blood cells, as well as the rate of dhS1P release from erythrocytes, regardless of oxygen availability. Plasma concentration of S1P was, however, reduced during the recovery phase, and this trend was augmented by hypoxia. On the other hand, GE in normoxia induced a selective increase in HDL-bound S1P. This effect disappeared when the exercise was performed in hypoxia, and it was associated with reduced S1P level in platelets and erythrocytes. We conclude that submaximal exercise elevates total plasma dhS1P concentration via increased availability of dihydrosphingosine resulting in enhanced dhS1P synthesis and release by blood cells. Maximal exercise, on the other hand, induces a selective increase in HDL-bound S1P, which is a consequence of mechanisms not related to blood cells. We also conclude that hypoxia reduces post-exercise plasma S1P concentration.

**CITATION:** Hodun K, Czuba M, Płoszczyca K et al. The effect of normobaric hypoxia on acute exercise-induced changes in blood sphingoid base-1-phosphates metabolism in cyclists. *Biol Sport*. 2024;41(2):xx–xx.

Received: 2023-03-05; Reviewed: 2023-07-13; Re-submitted: 2023-08-03; Accepted: 2023-08-17; Published: 2023-09-xx.

Corresponding author:

**Marcin Baranowski**  
Department of Physiology,  
Medical University of Białystok,  
Mickiewiczza 2c, Białystok  
15-222, Poland, Poland  
E-mail: marcin.baranowski@  
umb.edu.pl

**ORCID:**

Katarzyna Hodun  
0000-0002-2102-7638

Miłosz Czuba  
0000-0002-8322-2279

Kamila Płoszczyca  
0000-0003-3516-9124

Jerzy Sadowski  
0000-0002-1751-9613

Józef Langfort  
0000-0001-5710-5100

Adrian Chabowski  
0000-0002-7407-8156

Marcin Baranowski  
0000-0002-3714-5815

**Key words:**

Ceramide  
Red blood cells  
Simulated altitude  
Sphinganine-1-phosphate  
Sphingomyelin  
Thrombocytes

### INTRODUCTION

Sphingoid base-1-phosphates represent a subgroup of sphingolipids known for their high biological activity. They are produced via phosphorylation of free sphingoid bases by the enzyme sphingosine kinase (SphK). The two best known members of this subgroup are sphingosine-1-phosphate (S1P) and dihydrosphingosine-1-phosphate (dhS1P), which are synthesized from sphingosine and dihydrosphingosine, respectively. Sphingosine is a product of ceramide degradation by ceramidase, whereas dihydrosphingosine is an intermediate in the de novo sphingolipid synthesis pathway. S1P and dhS1P are irreversibly degraded by S1P lyase, or dephosphorylated back to free sphingoid bases by S1P phosphatase or nonspecific lipid phosphate phosphohydrolase [1].

Sphingoid base-1-phosphates can be exported to the extracellular space by facilitator superfamily transporter 2b, spinster homolog 2, and several members of the ATP-binding cassette transporter

family [2–4]. It is generally accepted that most of their biological effects are induced extracellularly via binding to a family of five specific membrane G-protein coupled receptors (S1PRs) [5].

Sphingoid base-1-phosphates are found in relatively high concentrations in the human plasma, where they are transported mainly by high-density lipoprotein (HDL) and albumin. In addition, large quantities of S1P and dhS1P are stored in red blood cells (RBCs) and platelets, which are characterized by high SphK activity and low expression of enzymes responsible for their degradation. RBCs release sphingoid base-1-phosphates constitutively, and were found to be the major source of circulating S1P and dhS1P. Platelets, on the other hand, secrete them only upon activation. Significant amounts of sphingoid base-1-phosphates are also constitutively released to the circulation by vascular endothelial cells [6].

There is an increasing body of evidence indicating that extracellular S1P is an important regulator of muscle function, likely involved in its adaptation to exercise. It affects the excitation-contraction coupling in a way resulting in an anti-fatigue effect, stimulates muscle regeneration via activation of satellite cells, enhances mitochondrial respiration, and induces angiogenesis [7].

We have previously found that concentration of sphingoid base-1-phosphates in the plasma is elevated in response to both acute exercise and training [8, 9]. Interestingly, hypoxia, which is commonly utilized in athletes' training programs due to its performance benefits, was recently shown to induce a similar effect on circulating S1P and dhS1P at rest [10]. Stimulation of A2B adenosine receptor in RBCs was found to induce activation of SphK and accumulation of S1P, indicating that adenosine may mediate the effect of hypoxia on circulating sphingoid base-1-phosphates metabolism [11]. Accumulation of S1P and dhS1P in response to hypoxia was also observed in human cerebral endothelial cell line, which was a consequence of reduced S1P lyase activity [12].

Altitude training has become a standard training protocol in many sports disciplines, including cycling, to increase exercise capacity at sea level, to acclimatize prior to competitions at altitude, or before ascending to altitude [13]. A sudden exposure to the hypoxic environment, or a longer stay at elevated altitude, induces numerous adaptations which can lead to improved athletes' performance at sea level. These mechanisms are generally attributed to either hematological, cardiovascular, or ventilatory effects of altitude training [14–16]. In addition, acute and chronic exposure to hypoxia induces several metabolic consequences in the body and combined with exercise presents an enormous challenge for athletes [17]. The process of adaptation to hypoxia is important not only for professional athletes. Due to the growing popularity and availability of high mountain tourism and mountain-related forms of recreation, issues related to the adaptation of the human body to hypoxia are becoming important to a growing number of people.

Therefore, considering the above facts, the aim of the current study was to determine the effect of normobaric hypoxia on acute changes in blood sphingolipid metabolism induced by exercise. Our hypothesis was that the increase in plasma sphingoid base-1-phosphates concentration in response to acute exercise is augmented by a concomitant exposure to hypoxia, which could mediate the beneficial effects of hypoxic training. In the present study we used the exercise protocols, namely graded exercise until exhaustion and 60 min of submaximal exercise, which we previously found to induce acute changes in the metabolism of circulating sphingoid base-1-phosphates [8, 18].

## MATERIALS AND METHODS

### *Experimental design*

The investigation conforms to the ethical norms and standards in the Declaration of Helsinki and was approved by the Bioethics Committee at the Medical University of Białystok (approval no.

R-I-002/325/2019). Each subject signed an informed consent before inclusion in the study.

Fifteen highly-trained male competitive cyclists (age  $25.4 \pm 8.4$  years, BMI  $21.6 \pm 1.8$  kg/m<sup>2</sup>, body fat content  $9.2 \pm 2.1\%$ ,  $VO_{2max}$   $61.4 \pm 3.1$  mL/kg/min) with an average training experience of  $6.3 \pm 2$  years participated in the study. All subjects possessed a valid medical certificate confirming the absence of contraindications to the practice of competitive sport activity.

The athletes were instructed to maintain their regular diet and supplementation throughout the experiment, and were asked to abstain from caffeine intake during 24 h preceding each test. All participants arrived at the facility one day before the start of each test series and consumed the same meals throughout their stay (40 kcal/kg/d, 50% carbohydrates, 20% proteins, and 30% fats).

The subjects were tested during two sessions, separated by two weeks, in either normoxic or hypoxic ( $FiO_2 = 16.5\%$ , equivalent to 2,000 m asl) conditions applied in a random order. The athletes were blinded to exercise conditions. The tests were performed in a room equipped with a normobaric hypoxia system (AirZone 25, Air Sport, Międzyzdroje, Poland) allowing to manipulate oxygen concentration in the air. Temperature (19°C), humidity (50%), and CO<sub>2</sub> concentration (700–800 ppm) were controlled and held constant.

In the morning of the first day of each session, two hours after a light breakfast, the subjects performed graded cycling exercise until volitional exhaustion (VE). Volitional exhaustion was defined as the participants' inability to continue exercising, despite strong encouragement by the testing staff. The exercise started with a workload of 120 W, which was then increased by 40 W every 3 min. The total duration of exposure to hypoxia during this test was ~35 min.

On the next day, following 24 h of rest (two hours after a light breakfast), the athletes performed a simulated 30 km individual time trial (TT) in a mountainous terrain. The TT was preceded by a 15 min warm-up, carried out according to the athletes' individual preferences, under oxygen concentration corresponding to the main exercise. The total duration of exposure to hypoxia during this test was ~90 min. Both tests were performed on subjects' personal bicycles connected to an electromagnetic bicycle trainer (Cyclus 2, RBM Elektronik-Automation GmbH, Leipzig, Germany). The athletes were allowed to consume water ad libitum during each exercise. The oxygen saturation of arterial blood (SpO<sub>2</sub>) and heart rate were measured using the WristOx2 pulse oximeter (Nonin Medical Inc., Plymouth, MN).

### *Blood fractionation*

During each test day blood samples were taken from the antecubital vein at three time points: before the onset of exercise, within 5 min following its cessation, and after 30 min of recovery in normoxia. Blood was put on ice immediately after sampling into 4 mL EDTA tubes. Erythrocytes, platelets, and platelet-free plasma were isolated by sequential centrifugation. Temperature was maintained at 4°C throughout whole procedure to prevent sphingoid base-1-phosphates

## Blood S1P in acute exercise in hypoxia

release from erythrocytes [19]. Separated blood cells were resuspended in cold PBS and flash frozen in liquid nitrogen.

HDL were isolated from the platelet-free plasma by sequential flotation ultracentrifugation in NaBr solution in a Sorvall RC M120 GX ultracentrifuge (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) equipped with a S120-AT2 rotor as described by Havel et al. [20] with some modifications. Briefly, plasma was centrifuged at 120,000 rpm for 85 min at 8°C at a density of 1.006 g/mL to remove very low-density lipoprotein, for 155 min at a density of 1.063 g/mL to remove low-density lipoprotein, and for 250 min at a density of 1.21 g/mL to obtain HDL. After the last centrifugation step lipoprotein-depleted plasma containing albumin was recovered from the bottom of the tube. To avoid oxidation of lipoproteins, 0.3 mM EDTA was present in all preparation steps. Densities of NaBr solutions used for density adjustments were checked with a digital densitometer (Densito 30P, Mettler Toledo, Columbus, OH). All samples were stored at (−80°C) until analysis.

### *Sphingoid base-1-phosphate release from erythrocytes*

Cold erythrocyte concentrate was resuspended in precooled plasma isolated from the same blood sample to obtain hematocrit of ~45%. To determine the baseline sphingoid base-1-phosphate concentration in the medium, an aliquot of the erythrocyte suspension was immediately transferred to a fresh tube and centrifuged at 4°C. The supernatant was then flash frozen in liquid nitrogen. The remaining portion of the erythrocyte suspension was incubated for 20 min at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Samples were then immediately cooled on ice and the medium was separated by centrifugation at 4°C. The rate of S1P and dhS1P release was calculated by subtracting their basal concentration in the medium from the value measured after the incubation.

### *Sphingolipid analysis*

The content of S1P, dhS1P, sphingosine, dihydrosphingosine, ceramide, and dihydroceramide was determined as previously described in detail [21]. Briefly, lipids were extracted from samples in the presence of internal standards (C17-sphingosine and C17-S1P, Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL). An aliquot of the lipid extract was transferred to a fresh tube with pre-added N-palmitoyl-D-erythro-sphingosine (C17 base, Avanti Polar Lipids) as an internal standard, and then subjected to alkaline hydrolysis to deacylate ceramide and dihydroceramide to sphingosine and dihydrosphingosine, respectively. The amounts of S1P and dhS1P were determined indirectly after dephosphorylation to sphingosine and dihydrosphingosine, respectively, with the use of alkaline phosphatase. Free sphingosine and dihydrosphingosine, dephosphorylated sphingoid base-1-phosphates, and sphingoid bases released from ceramide and dihydroceramide were then converted to their o-phthalaldehyde derivatives and analyzed using a UPLC system (Nexera, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) equipped with a fluorescence detector (RF-20AXs) and a C18 reversed-phase column (Reproshell ODS-1, 2.7 μm, 125 × 3 mm, Dr Maisch, Ammerbuch, Germany). The isocratic eluent composition

of acetonitrile:water (84:16, v/v) and a flow rate of 0.4 mL/min were used. Column temperature was maintained at 30°C.

For sphingomyelin analysis, lipids were extracted from erythrocytes and platelets by the method of Folch. Next, sphingomyelin was separated by thin-layer chromatography using the method described by Mahadevappa et al. [22]. The gel bands corresponding to the sphingomyelin standard were scrapped off the plates and transferred into fresh tubes containing pentadecanoic acid as an internal standard. Sphingomyelin fatty acids were then transmethylated in the presence of 14% boron trifluoride in methanol at 100°C for 90 min. The resulting methyl esters of palmitic, stearic, arachidic, behenic and lignoceric acid were analyzed by means of gas-liquid chromatography using a Hewlett-Packard 5890 Series II system equipped with a double flame ionization detector and Agilent (Santa Clara, CA) CP-Sil 88 capillary column (100 m, 0.25 mm i.d.). The content of sphingomyelin is presented as the sum of all analyzed individual fatty acid methyl esters.

Hemoglobin concentration was determined using Drabkin's reagent kit (Sigma, Schnellendorf, Germany). Protein concentration was measured with the BCA protein assay kit (Sigma). Bovine serum albumin (fatty acid free, Sigma) was used as a standard.

### *Statistical analysis*

All data are presented as means ± SD. Statistical comparisons were made by using two-way ANOVA (with one factor being oxygen concentration during exercise, and the other factor being time) followed by Student's t-test for paired samples. Correction for multiple comparisons was performed using Benjamini-Hochberg procedure. P < 0.05 was considered statistically significant.

## RESULTS

### *General exercise and subjects characteristics*

The average duration of the GE in normoxia and hypoxia was 20.2 ± 1.9 and 18.0 ± 1.9 min, respectively. The maximal work rate during the test performed under normoxic conditions was 5.1 ± 0.3 W/kg of body weight, whereas in hypoxia it amounted to 4.6 ± 0.4 W/kg. The heart rate at the point of volitional exhaustion was 193 ± 8 and 190 ± 9 bpm in normoxia and hypoxia, respectively. The resting SpO<sub>2</sub> under normoxia was 98.0 ± 0.8, and during the final stage of the GE it was reduced to 91.9 ± 3.0%. In hypoxia, the SpO<sub>2</sub> amounted to 93.3 ± 3.4 at rest, and 84.3 ± 5.4% at the point of exhaustion.

The duration of the TT in normoxia was 61.1 ± 5.4 min, whereas in hypoxia it increased to 63.7 ± 3.0 min. The average work rate during this test amounted to 3.6 ± 0.3 and 3.3 ± 0.2 W/kg of body weight under normoxic and hypoxic conditions, respectively. The heart rate was 176 ± 9, 177 ± 8, and 179 ± 10 bpm at 10, 20, and 30 km of the TT in normoxia, respectively. During the test performed under hypoxic conditions the corresponding heart rates were 174 ± 11, 176 ± 13, and 180 ± 12 bpm. In the normoxic TT, the SpO<sub>2</sub> values at rest, and at 10, 20, and 30 km of the test were

**TABLE 1.** The content of sphingolipids in erythrocytes and platelets sampled before, immediately after, and following 30 min of recovery from a graded cycling exercise until volitional exhaustion (GE) performed either in normoxia or at a simulated altitude of 2,000 m asl (n = 15).

	Normoxic GE			Hypoxic GE		
	Basal	Post-ex.	Recovery	Basal	Post-ex.	Recovery
<b>Erythrocytes (pmol/mg Hb)</b>						
Sphingosine	0.29 ± 0.1	0.294 ± 0.123	0.274 ± 0.1	0.307 ± 0.066	0.299 ± 0.061	0.326 ± 0.062
dhSph	0.024 ± 0.008	0.034 ± 0.017	0.033 ± 0.018	0.034 ± 0.012	0.035 ± 0.01	0.039 ± 0.011
S1P	4.29 ± 1.05	4.51 ± 1.23	4.08 ± 1.11	5.38 ± 1.15	4.57 ± 0.97*	5.04 ± 1.27#
dhS1P	1.92 ± 0.66	2.25 ± 0.94	2.23 ± 0.76	2.71 ± 0.95	2.2 ± 0.46	2.85 ± 1.17
Ceramide	35.1 ± 8.5	37.6 ± 10.3	28.1 ± 8.2*#	41.8 ± 10.6	42.9 ± 9.5	43.7 ± 10.7
dhCer	2.02 ± 0.97	2.06 ± 0.82	1.57 ± 0.67*#	2.34 ± 0.71	2.53 ± 1.03	2.63 ± 1.14
Sphingomyelin	1260 ± 140	1224 ± 133	1202 ± 121	1390 ± 172	1295 ± 128*	1429 ± 224#
<b>Platelets (pmol/mg protein)</b>						
Sphingosine	51.5 ± 34	51.7 ± 42.2	60.2 ± 50	60.5 ± 29	51.9 ± 40.2	51.9 ± 37.2
dhSph	11.5 ± 6.5	11.9 ± 9.2	13.6 ± 10.5	13.7 ± 6.6	12.8 ± 9.8	13.6 ± 8.7
S1P	536 ± 209	493 ± 217	560 ± 223	720 ± 181	565 ± 235*	564 ± 212*
dhS1P	214 ± 96	211 ± 100	254 ± 106#	309 ± 69	272 ± 128	277 ± 112
Ceramide	944 ± 538	784 ± 241	771 ± 256	967 ± 220	890 ± 404	973 ± 381
dhCer	516 ± 274	429 ± 174	444 ± 198	576 ± 165	507 ± 204	543 ± 199
Sphingomyelin	19912 ± 4912	17553 ± 4329	18655 ± 3843	22607 ± 3755	19782 ± 5444	22564 ± 4900

The results are means ± SD. \* – p < 0.05 vs. the basal value, # – p < 0.05 vs. the post-exercise value. S1P – sphingosine-1-phosphate, dhCer – dihydroceramide, dhS1P – dihydrosphingosine-1-phosphate, dhSph – dihydrosphingosine, Hb – hemoglobin.

97.8 ± 2.0, 94.5 ± 2.4, 94.1 ± 1.7 and 93.6 ± 2.3%, respectively. Under hypoxic conditions the corresponding SpO<sub>2</sub> values were 93.3 ± 3.8, 85.6 ± 3.8, 86 ± 4.2 and 86.5 ± 2.7%.

#### Graded exercise until volitional exhaustion

The total plasma S1P concentration increased in response to GE performed under normoxic conditions, which resulted entirely from the rise in the content of the HDL-bound pool. This effect was, however, transient and disappeared following 30 min of rest (Fig. 1). In addition, compared to the basal values, the content of the HDL-bound dihydrosphingosine was reduced (Fig. 1), whereas that of dhS1P in platelets (Table 1) was increased after 30 min of recovery from the exercise. In erythrocytes statistically significant changes induced by normoxic GE were observed only for ceramide and dihydroceramide levels, which were reduced below the basal values following 30 min of recovery (Table 1). The rate of sphingoid base-1-phosphates release from RBCs was not affected by the exercise (Fig. 3).

In contrast to normoxic conditions, GE performed in hypoxia did not induce statistically significant changes in the concentration of any of the measured sphingolipids in either plasma or its fractions (Fig. 1). On the other hand, in erythrocytes the content of S1P and sphingomyelin decreased at the end of the exercise (Table 1). This effect, however, disappeared following 30 min of rest. A similar

reduction in S1P level was observed in thrombocytes, but in contrast to RBCs, it persisted during the recovery period (Table 1). Hypoxic GE did not induce statistically significant changes in the rate of sphingoid base-1-phosphates release from erythrocytes (Fig. 3).

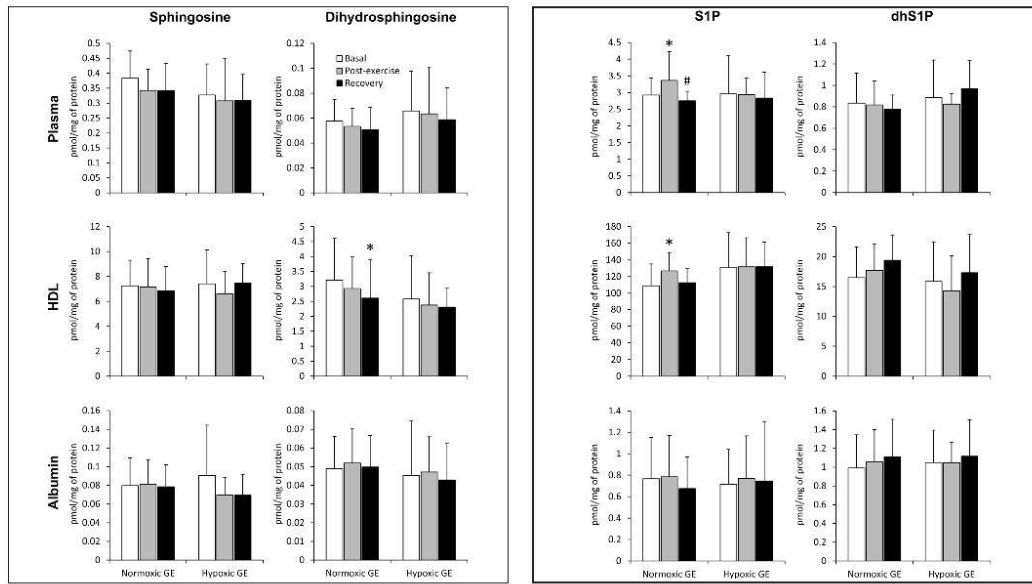
GE, either under normoxic or hypoxic conditions, did not induce statistically significant changes in the concentration of ceramide and dihydroceramide in plasma or its fractions (data not shown).

#### Simulated 30 km individual time trial

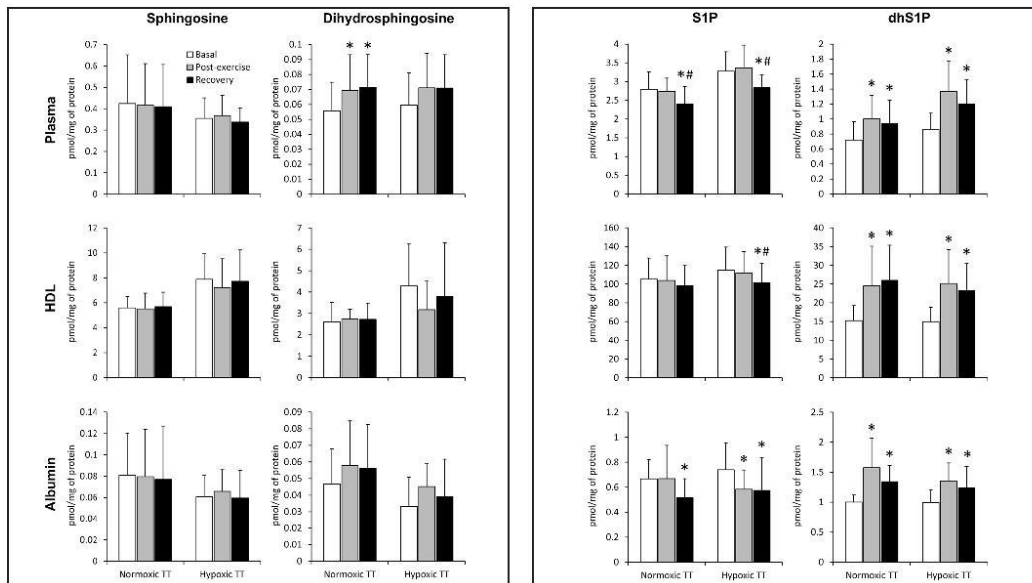
The TT performed under normoxic conditions induced an increase in the total plasma concentration of dihydrosphingosine and dhS1P that persisted during the recovery period. The same pattern of changes in the dhS1P level was observed also in the case of HDL- and albumin-bound fractions of this sphingolipid. On the other hand, the total S1P concentration in the plasma was reduced below the basal level following 30 min of recovery. This effect resulted from a decrease in the level of the albumin-bound S1P, since its content in the HDL-bound fraction did not show a significant change (Fig. 2).

Similarly to plasma, the level of dihydrosphingosine and dhS1P in RBCs and thrombocytes increased in response to normoxic TT, and remained elevated during the recovery period (Table 2). The same pattern of changes was observed for the rate of dhS1P release from erythrocytes (Fig. 3). In addition, compared to the basal level,

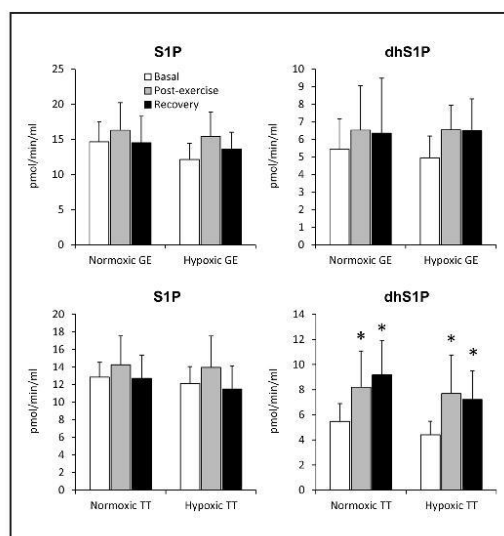
### Blood S1P in acute exercise in hypoxia



**FIG. 1.** The content of sphingolipids in the plasma, as well as in its high-density lipoprotein (HDL) and albumin fractions sampled before, immediately after, and following 30 min of recovery from a graded cycling exercise until volitional exhaustion (GE) performed either in normoxia or at a simulated altitude of 2,000m asl (n=15). The results are means  $\pm$  SD. Note: \* –  $p < 0.05$  vs. the basal value, # –  $p < 0.05$  vs. the post-exercise value. HDL – high-density lipoprotein, dhS1P – dihydrosphingosine-1-phosphate, S1P – sphingosine-1-phosphate.



**FIG. 2.** The content of sphingolipids in the plasma, as well as in its high-density lipoprotein (HDL) and albumin fractions sampled before, immediately after, and following 30 min of recovery from a simulated 30km individual cycling time trial (TT) performed either in normoxia or at a simulated altitude of 2,000m asl (n=15). The results are means  $\pm$  SD. \* –  $p < 0.05$  vs. the basal value, # –  $p < 0.05$  vs. the post-exercise value. HDL – high-density lipoprotein, dhS1P – dihydrosphingosine-1-phosphate, S1P – sphingosine-1-phosphate.



**FIG. 3.** The rate of sphingosine-1-phosphate (S1P) and dihydrosphingosine-1-phosphate (dhS1P) release from erythrocytes sampled before, immediately after, and following 30 min of recovery from a graded cycling exercise until volitional exhaustion (GE) or a simulated 30km individual cycling time trial (TT) performed either in normoxia or at a simulated altitude of 2,000m asl (n=15). Notes: The results are means  $\pm$  SD. \* –  $p < 0.05$  vs. the basal value.

the erythrocyte S1P content was reduced, and platelet dihydroceramide was increased following 30 min of rest (Table 2).

The TT performed in hypoxia induced an increase in the concentration of dhS1P in the plasma, as well as in HDL and albumin fractions. The level of this sphingolipid remained elevated during the recovery period. On the other hand, the total plasma concentration of S1P at this time point, as well as its content in both HDL and albumin fractions, was reduced below the basal value. In the case of the albumin-bound S1P, the reduction was observed also immediately after the exercise (Fig. 2).

Similarly to plasma, the level of dhS1P in erythrocytes and platelets increased in response to hypoxic TT, and remained elevated during the recovery period. In RBCs the same pattern of changes was observed also for the content of dihydrosphingosine (Table 2). The rate of dhS1P release from erythrocytes was increased by the TT performed in hypoxia, and remained elevated following 30 min of recovery (Fig. 3).

TT, either under normoxic or hypoxic conditions, did not induce statistically significant changes in the concentration of ceramide and dihydroceramide in plasma or its fractions (data not shown).

## DISCUSSION

In line with our previous results [8, 18], we observed that metabolism of circulating S1P and dhS1P was markedly affected by acute exercise in normoxia. However, in the present study these observations were, for the first time, extended by determination of sphingoid

**TABLE 2.** The content of sphingolipids in erythrocytes and platelets sampled before, immediately after, and following 30 min of recovery from a simulated 30 km individual cycling time trial (TT) performed either in normoxia or at a simulated altitude of 2,000 m asl (n = 15).

	Normoxic TT			Hypoxic TT		
	Basal	Post-ex.	Recovery	Basal	Post-ex.	Recovery
<b>Erythrocytes (pmol/mg Hb)</b>						
Sphingosine	0.498 $\pm$ 0.126	0.491 $\pm$ 0.084	0.553 $\pm$ 0.14	0.349 $\pm$ 0.068	0.353 $\pm$ 0.073	0.353 $\pm$ 0.066
dhSph	0.095 $\pm$ 0.037	0.134 $\pm$ 0.045*	0.151 $\pm$ 0.034*#	0.079 $\pm$ 0.027	0.127 $\pm$ 0.034*	0.121 $\pm$ 0.028*
S1P	6.53 $\pm$ 1.31	6.29 $\pm$ 1.1	5.93 $\pm$ 1.22*	5.26 $\pm$ 1.02	5.27 $\pm$ 1.15	4.91 $\pm$ 0.95
dhS1P	5.57 $\pm$ 0.89	8 $\pm$ 1.23*	7.91 $\pm$ 1.98*	3.66 $\pm$ 0.9	5.27 $\pm$ 1.38*	5.46 $\pm$ 1.36*
Ceramide	67.4 $\pm$ 15.5	69.6 $\pm$ 11.7	66.1 $\pm$ 13.9	52.1 $\pm$ 12.9	48.4 $\pm$ 11.5	49.9 $\pm$ 12.9
dhCer	9.73 $\pm$ 6.09	10 $\pm$ 5.23	9.51 $\pm$ 5.41	7.07 $\pm$ 4.43	5.98 $\pm$ 2.36	6.42 $\pm$ 3.9
Sphingomyelin	1267 $\pm$ 178	1141 $\pm$ 142	1174 $\pm$ 176	1349 $\pm$ 162	1311 $\pm$ 165	1295 $\pm$ 169
<b>Platelets (pmol/mg protein)</b>						
Sphingosine	51.7 $\pm$ 19.9	53.2 $\pm$ 20.6	60.6 $\pm$ 26.5	46.5 $\pm$ 15.2	40.8 $\pm$ 13.7	41.7 $\pm$ 18.1
dhSph	9.64 $\pm$ 4.66	13.2 $\pm$ 6.5*	15.28 $\pm$ 8*#	9.18 $\pm$ 3.88	9.74 $\pm$ 3.23	10.77 $\pm$ 4.32
S1P	651 $\pm$ 206	590 $\pm$ 153	640 $\pm$ 115	653 $\pm$ 170	584 $\pm$ 108	600 $\pm$ 148
dhS1P	231 $\pm$ 99	303 $\pm$ 98*	341 $\pm$ 87*	250 $\pm$ 79	300 $\pm$ 67*	334 $\pm$ 88*#
Ceramide	655 $\pm$ 204	600 $\pm$ 205	668 $\pm$ 305	672 $\pm$ 155	597 $\pm$ 160	614 $\pm$ 180
dhCer	366 $\pm$ 143	337 $\pm$ 143	404 $\pm$ 168#	407 $\pm$ 119	360 $\pm$ 89	351 $\pm$ 122
Sphingomyelin	21663 $\pm$ 5434	19328 $\pm$ 3566	21622 $\pm$ 3358	20251 $\pm$ 3319	18845 $\pm$ 2733	19371 $\pm$ 3827

The results are means  $\pm$  SD. \* –  $p < 0.05$  vs. the basal value, # –  $p < 0.05$  vs. the post-exercise value. S1P – sphingosine-1-phosphate, dhCer – dihydroceramide, dhS1P – dihydrosphingosine-1-phosphate, dhSph – dihydrosphingosine, Hb – hemoglobin.

## Blood S1P in acute exercise in hypoxia

base-1-phosphates concentrations in their major plasma pools, and the rate of their release from RBCs. In addition, the effect of hypoxia on exercise-induced changes in sphingolipid metabolism has not been studied so far.

The total plasma S1P concentration was transiently increased following GE in normoxia, a similar response was observed in our previous report where athletes performed identical exercise protocol on a rowing ergometer [8]. Here we found that this effect results entirely from the increased concentration of the HDL-bound S1P, which is considered to be the plasma S1P pool with the highest biological activity [23, 24]. Interestingly, endurance training was also reported to selectively increase the HDL-bound S1P [9]. In line with our previous study [8], the GE-induced elevation in plasma S1P concentration was not associated with changes in its content, or the rate of its release, in blood cells, which argues against the involvement of either RBCs or platelets in this phenomenon.

On the other hand, the TT in both normoxia and hypoxia induced an increase in the total plasma dhS1P concentration, resulting from elevation in HDL- as well as albumin-bound pools. We found that this effect was a consequence of increased availability of dihydrosphingosine in the plasma, which caused accumulation of dhS1P in RBCs and platelets, and ultimately augmented dhS1P release to the circulation. In general, these results are in line with our previous study where athletes performed a similar submaximal exercise (60 min at 65% of  $VO_{2max}$ ) on a rowing ergometer [8]. However, in the present report the total plasma S1P concentration was reduced during the recovery period due to a decrease in the amount of the albumin-bound pool. A similar tendency was observed by Bergman et al. [25] in the serum of untrained subjects following 2 hours of recovery from a 90-minute exercise on a cycle ergometer. It should be noted that acute changes in plasma volume induced by exercise did not contribute to alterations in sphingolipid concentrations found in our study, since they were expressed on a protein, not volume basis.

We can only speculate on the origin of dihydrosphingosine released to the circulation during the TT. In our previous report, dihydrosphingosine was not found to be released across a leg either at rest or during exercise and recovery period [8]. However, our experiment on rats identified liver as a prominent source of plasma dihydrosphingosine [26]. It is, therefore, possible that the rate of its hepatic release increases during prolonged submaximal exercise.

As already mentioned in the introduction, Sun et al. [10] found that S1P levels in both plasma and RBCs are elevated following ascent to high altitude. However, in the present study, contrary to our initial hypothesis, hypoxia did not augment the exercise-induced increase in circulating sphingoid base-1-phosphate concentration. The response observed for dhS1P following TT was not affected by concomitant exposure to simulated altitude. Surprisingly, the increase in plasma S1P concentration induced by GE was abolished when the exercise was performed under hypoxic conditions. This effect was

associated with a reduction in S1P content in erythrocytes and platelets, that was not observed in normoxia, which indicates that blood cells contributed to this phenomenon. In addition, hypoxia enhanced the reduction in plasma S1P concentration observed during the recovery from TT. First of all, the reduction was no longer limited to the albumin-bound pool, since a similar effect was found also for the HDL-bound S1P. Secondly, in hypoxia the decrease in the former pool developed already at the end of the exercise.

The lack of increase in the concentration of circulating S1P under exposure to simulated altitude could be explained by insufficient strength and duration of the hypoxic stimulus. In our study, the athletes spent up to 90 minutes at a simulated altitude of 2,000 m, whereas Sun et al. [10] exposed the subjects to 5,260 m for at least 12 h. Moreover, they showed that in mice exposure to a simulated altitude of 5,260 m lasting more than 6 h was required to increase the concentration of S1P in plasma and erythrocytes. The fact that in our study hypoxia tended to reduce the concentration of circulating S1P may seem puzzling. It should be noted, however, that D'Alessandro et al. [27] found that the time course of changes in erythrocyte S1P content during exposure to high altitude included a brief period of initial reduction preceding the subsequent increase.

Several studies showed that plasma S1P concentration decreases upon strong activation of inflammatory pathways. Such effect was observed following lipopolysaccharide administration to mice, as well as in patients with acute pancreatitis, sepsis, and COVID-19 infection [28–31]. In our recent paper including results obtained during the same experiment, we found that hypoxia markedly augmented oxidative stress and inflammatory response during both GE and TT [32]. It is, therefore, possible that these factors were responsible for the hypoxia-induced reduction in the post-exercise concentration of circulating S1P.

It is widely accepted that live high-train low (LHTL) model of altitude training is more effective in terms of athletic performance improvements than the live high-train high strategy [33]. In addition, an effective variation of the LHTL model has been developed, where athletes live and perform low-intensity training at moderate altitude and only high-intensity training takes place at low altitude [34]. Our observation that hypoxia abolishes the increase in plasma S1P concentration induced by high-intensity exercise supports the notion that in altitude programs this type of training should be performed at low altitude. Furthermore, considering the important role of extracellular S1P in muscle regeneration [7], our results raise a question as to whether hypoxic training should be implemented during recovery from injuries.

Sun et al. [10] found that elevation in the content of intracellular S1P plays a key role in hypoxia-induced increase in 2,3-bisphosphoglycerate (2,3-BPG) level in RBCs. The mechanism underlying this effect involves S1P-induced anchoring of deoxy-Hb to the plasma membrane resulting in enhanced release of membrane-bound glycolytic enzymes to the cytosol. We have recently reported that



concentration of 2,3-BPG in RBCs sampled during the same experiment was reduced following the TT in hypoxia [35]. The effect developed despite the lack of changes in the content of S1P in erythrocytes. Our findings indicate that S1P is not involved in alterations in RBCs 2,3-BPG content induced by acute exercise in hypoxia.

S1P and dhS1P were shown to activate S1PRs with equal potency [36] and, therefore, it is commonly assumed that they induce similar effects. This is, however, not always the case. First of all, these two sphingoid base-1-phosphates are characterized by different distribution between plasma fractions and show distinct transport protein preferences [37]. Secondly, extracellular S1P was reported to have a much shorter half-life than dhS1P [38]. It was also found that dhS1P induces stronger S1PR-mediated reduction in intracellular cAMP concentration and higher magnitude of calcium mobilization compared to S1P [38, 39]. In some studies S1P and dhS1P were even shown to induce opposite effects [40, 41]. Interestingly, in our study plasma S1P concentration was increased only in response to a maximal exercise, whereas that of dhS1P only by prolonged submaximal effort. This observation suggests that S1P and dhS1P may be involved in different aspects of muscle adaptation to exercise. As already mentioned in the introduction, S1P emerged as an important regulator of muscle function [7]. However, the role of dhS1P in muscle biology has not been studied so far and represents an interesting area for further research.

## CONCLUSIONS

In summary, we found that simulated 30 km time trial increased dhS1P concentration in plasma (both HDL- and albumin-bound) and

blood cells, as well as the rate of dhS1P release from erythrocytes, regardless of oxygen availability. The plasma concentration of S1P was, however, reduced during the recovery phase, and this trend was augmented by hypoxia. On the other hand, graded exercise until exhaustion in normoxia induced a selective increase of HDL-bound S1P in the plasma. This effect disappeared when the exercise was performed under hypoxic conditions, and it was associated with reduced S1P level in blood cells. We conclude that submaximal exercise elevates total plasma dhS1P concentration via increased availability of dihydrosphingosine resulting in enhanced dhS1P synthesis and release by blood cells. Maximal exercise, on the other hand, induces a selective increase in HDL-bound S1P, which is a consequence of mechanisms not related to blood cells. We also conclude that hypoxia does not affect the exercise-induced changes in metabolism of circulating dhS1P, but reduces post-exercise plasma S1P concentration. Therefore, extracellular S1P does not seem to be involved in adaptation to acute exercise in hypoxia.

## Acknowledgements

We thank dr Małgorzata Charmas for the technical assistance during the exercise tests. The study was supported by the National Science Centre, Poland (grant no. 2018/31/B/NZ7/02543), and by the Medical University of Białystok (grant no. B.SUB.23.324).

## Conflict of interest declaration

The authors declare no conflict of interest.

## REFERENCES

- Hannun YA, Obeid LM. Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2018 9(3):175–191.
- Hisano Y, Kobayashi N, Yamaguchi A, Nishi T. Mouse SPNS2 functions as a sphingosine-1-phosphate transporter in vascular endothelial cells. *PLoS One* 2012 6(5):e38941.
- Yu TM, Ishizu AN, Foo JC, Toh XR, Zhang F, Whee DM, Torta F, Cazenave-Gassiot A, Matsumura T, Kim S, et al. Mfsd2b is essential for the sphingosine-1-phosphate export in erythrocytes and platelets. *Nature* 2017 50(7677):524–528.
- Takabe K, Kim RH, Allegood JC, Mitra P, Ramachandran S, Nagahashi M, Harikumar KB, Hait NC, Milstien S, Spiegel S. Estradiol induces export of sphingosine 1-phosphate from breast cancer cells via ABCG1 and ABCG2. *J Biol Chem* 2010 85(14):10477–10486.
- Takabe K, Paugh SW, Milstien S, Spiegel S. "Inside-out" signaling of sphingosine-1-phosphate: therapeutic targets. *Pharmacol Rev* 2008 0(2):181–195.
- Ksiazek M, Chacinska M, Chabowski A, Baranowski M. Sources, metabolism, and regulation of circulating sphingosine-1-phosphate. *J Lipid Res* 2015 6(7):1271–1281.
- Hodun K, Chabowski A, Baranowski M. Sphingosine-1-phosphate in acute exercise and training. *Scand J Med Sci Sports* 2021 1(5):945–955.
- Baranowski M, Blachnio-Zabielska AU, Charmas M, Helge JW, Dela F, Ksiazek M, Dlugolecka B, Klusiewicz A, Chabowski A, Gorski J. Exercise increases sphingoid base-1-phosphate levels in human blood and skeletal muscle in a time- and intensity-dependent manner. *Eur J Appl Physiol* 2015 115(5):993–1003.
- Ksiazek M, Charmas M, Klusiewicz A, Zabielski P, Dlugolecka B, Chabowski A, Baranowski M. Endurance training selectively increases high-density lipoprotein-bound sphingosine-1-phosphate in the plasma. *Scand J Med Sci Sports* 2018 8(1):57–64.
- Sun K, Zhang Y, D'Alessandro A, Nemkov T, Song A, Wu H, Liu H, Adebisi M, Huang A, Wen YE, et al. Sphingosine-1-phosphate promotes erythrocyte glycolysis and oxygen release for adaptation to high-altitude hypoxia. *Nat Commun* 2016 :12086.
- Sun K, Zhang Y, Bogdanov MV, Wu H, Song A, Li J, Dowhan W, Idowu M, Juneja HS, Molina JG, et al. Elevated adenosine signaling via adenosine A2B receptor induces normal and sickle erythrocyte sphingosine kinase 1 activity. *Blood* 2015 25(10):1643–1652.
- Testai FD, Kilkuš JP, Berdyshev E, Gorshkova I, Natarajan V, Dawson G. Multiple sphingolipid abnormalities following cerebral microendothelial hypoxia. *J Neurochem* 2014 31(4):530–540.
- Ploszczyca K, Langfort J, Czuba M. The Effects of Altitude Training on Erythropoietic Response and Hematological Variables in Adult

- Athletes. A Narrative Review. *Front Physiol* 2018 :375.
14. Levine BD, Stray-Gundersen J. "Living high-training low": effect of moderate-altitude acclimatization with low-altitude training on performance. *J Appl Physiol* (1985) 1997 3(1):102–112.
  15. Naeije R. Physiological adaptation of the cardiovascular system to high altitude. *Prog Cardiovasc Dis* 2010 2(6):456–466.
  16. Townsend NE, Gore CJ, Ebert TR, Martin DT, Hahn AG, Chow CM. Ventilatory acclimatization is beneficial for high-intensity exercise at altitude in elite cyclists. *Eur J Sport Sci* 2016 6(8):895–902.
  17. Kayser B. Nutrition and energetics of exercise at altitude. Theory and possible practical implications. *Sports Med* 1994 7(5):309–323.
  18. Baranowski M, Charmas M, Dlugolecka B, Gorski J. Exercise increases plasma levels of sphingoid base-1 phosphates in humans. *Acta Physiol (Oxf)* 2011 03(3):373–380.
  19. Hanel P, Andreani P, Graler MH. Erythrocytes store and release sphingosine 1-phosphate in blood. *FASEB J* 2007 1(4):1202–1209.
  20. Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* 1955 4(9):1345–1353.
  21. Knapp M, Lisowska A, Zabielski P, Musial W, Baranowski M. Sustained decrease in plasma sphingosine-1-phosphate concentration and its accumulation in blood cells in acute myocardial infarction. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2013 06:53–61.
  22. Mahadevappa VG, Holub BJ. Chromatographic analysis of phosphoinositides and their breakdown products in activated blood platelets/neutrophils. In: Kuksis A, editor. *Chromatography of Lipids in Biomedical Research and Clinical Diagnosis*. Amsterdam: Elsevier; 1987. p. 225–265.
  23. Wilkerson BA, Grass GD, Wing SB, Argraves WS, Argraves KM. Sphingosine 1-phosphate (S1P) carrier-dependent regulation of endothelial barrier: high density lipoprotein (HDL)-S1P prolongs endothelial barrier enhancement as compared with albumin-S1P via effects on levels, trafficking, and signaling of S1P1. *J Biol Chem* 2012 87(53):44645–44653.
  24. Blaho VA, Galvani S, Engelbrecht E, Liu C, Swendeman SL, Kono M, Proia RL, Steinman L, Han MH, Hla T. HDL-bound sphingosine-1-phosphate restrains lymphopoiesis and neuroinflammation. *Nature* 2015 23(7560):342–346.
  25. Bergman BC, Brozinick JT, Strauss A, Bacon S, Kerege A, Bui HH, Sanders P, Siddall P, Kuo MS, Perreault L. Serum sphingolipids: relationships to insulin sensitivity and changes with exercise in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2015 09(4):E398–E408.
  26. Ksiązek M, Baranowska U, Chabowski A, Baranowski M. Arteriovenous Sphingosine-1-Phosphate Differences Across Selected Organs of the Rat. *Cell Physiol Biochem* 2018 5(1):67–77.
  27. D'Alessandro A, Nemkov T, Sun K, Liu H, Song A, Monte AA, Subudhi AW, Lovering AT, Dvorkin D, Julian CG, et al. AltitudeOmics: Red Blood Cell Metabolic Adaptation to High Altitude Hypoxia. *J Proteome Res* 2016 5(10):3883–3895.
  28. Kononczuk T, Lukaszuk B, Zendzian-Plotrowska M, Dabrowski A, Krzyżak M, Ostrowska L, Kurek K. Plasma Sphingolipids in Acute Pancreatitis. *Int J Mol Sci* 2017 8(12):2606.
  29. Coldewey SM, Benetti E, Collino M, Pfeilschifter J, Sponholz C, Bauer M, Huwiler A, Thiemermann C. Elevation of serum sphingosine-1-phosphate attenuates impaired cardiac function in experimental sepsis. *Sci Rep* 2016 :27594.
  30. Dong A, Sunkara M, Panchatcharam M, Salous A, Selim S, Morris AJ, Smyth SS. Synergistic effect of anemia and red blood cells transfusion on inflammation and lung injury. *Adv Hematol* 2012 012:924042.
  31. Marfia G, Navone S, Guarnaccia L, Campanella R, Mondoni M, Locatelli M, Barassi A, Fontana L, Palumbo F, Garzia E, et al. Decreased serum level of sphingosine-1-phosphate: a novel predictor of clinical severity in COVID-19. *EMBO Mol Med* 2021 3(1):e13424.
  32. Maciejczyk M, Zalewska A, Gryciuk M, Hodun K, Czuba M, Płoszczyca K, Charmas M, Sadowski J, Baranowski M. Effect of Normobaric Hypoxia on Alterations in Redox Homeostasis, Nitrosative Stress, Inflammation, and Lysosomal Function following Acute Physical Exercise. *Oxid Med Cell Longev* 2022 022:4048543.
  33. Sinex JA, Chapman R. F. Hypoxic training methods for improving endurance exercise performance. *J Sport Health Sci* 2015; 4(4):325–332.
  34. Chapman RF, Stray-Gundersen J, Levine BD. Individual variation in response to altitude training. *J Appl Physiol* 1998 5(4):1448–1456.
  35. Płoszczyca K, Czuba M, Chalimoniuk M, Gajda R, Baranowski M. Red Blood Cell 2,3-Diphosphoglycerate Decreases in Response to a 30 km Time Trial Under Hypoxia in Cyclists. *Front Physiol* 2021 2:670977.
  36. Van Brocklyn JR, Lee MJ, Menzeleev R, Olivera A, Edsall L, Cuvillier O, Thomas DM, Coopman PJ, Thangada S, Liu CH, et al. Dual actions of sphingosine-1-phosphate: extracellular through the Gi-coupled receptor Edg-1 and intracellular to regulate proliferation and survival. *J Cell Biol* 1998 42(1):229–240.
  37. Mishima Y, Kurano M, Kobayashi T, Nishikawa M, Ohkawa R, Tozuka M, Yatomi Y. Dihydro-sphingosine 1-phosphate interacts with carrier proteins in a manner distinct from that of sphingosine 1-phosphate. *Biosci Rep* 2018 8(5):BSR20181288.
  38. Callihan P, Zitomer NC, Stoeling MV, Kennedy PC, Lynch KR, Riley RT, Hooks SB. Distinct generation, pharmacology, and distribution of sphingosine 1-phosphate and dihydrosphingosine 1-phosphate in human neural progenitor cells. *Neuropharmacology* 2012 2(2):988–996.
  39. Katsuma S, Hada Y, Shiojima S, Hirasawa A, Tanoue A, Takagaki K, Ohgi T, Yano J, Tsujimoto G. Transcriptional profiling of gene expression patterns during sphingosine 1-phosphate-induced mesangial cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 2003 00(2):577–584.
  40. Bu S, Kapanadze B, Hsu T, Trojanowska M. Opposite effects of dihydrosphingosine 1-phosphate and sphingosine 1-phosphate on transforming growth factor-beta/Smad signaling are mediated through the PTEN/PPM1A-dependent pathway. *J Biol Chem* 2008 83(28):19593–19602.
  41. Magaye RR, Savira F, Hua Y, Xiong X, Huang L, Reid C, Flynn B, Kaye D, Liew D, Wang BH. Exogenous dihydrosphingosine 1 phosphate mediates collagen synthesis in cardiac fibroblasts through JAK/STAT signalling and regulation of TIMP1. *Cell Signal* 2020 2:109629.

## 10. Streszczenie w języku polskim

Ekspozycja organizmu na warunki hipoksyczne powoduje aktywację licznych procesów adaptacyjnych, które prowadzą do zwiększenia wydolności fizycznej organizmu. Stąd też, metoda ta od lat jest powszechnie wykorzystywana przez sportowców w celu poprawy wyników w dyscyplinach wytrzymałościowych. Do korzystnych efektów wynikających z ekspozycji organizmu na hipoksję zaliczamy m.in. wzrost pojemności tlenowej krwi, gęstości mitochondriów, kapilaryzacji tkanki mięśniowej, jak również zwiększoną aktywność enzymów zaangażowanych w utlenianie substratów energetycznych.

Sfingozyno-1-fosforan (S1P) jest pochodną sfingolipidów będących nie tylko istotnymi komponentami błon komórkowych, ale również aktywnymi biologicznie mediatorami lipidowymi zaangażowanymi w wewnątrzkomórkową transmisję sygnałów. Płytki krwi i erytrocyty są uważane za magazyny S1P ze względu na wysoką aktywność kinazy sfingozyny (SphK), enzymu odpowiedzialnego za syntezę S1P oraz niewielką aktywność enzymów odpowiedzialnych za degradację tego związku. Lipid ten występuje w wysokim stężeniu w osoczu krwi człowieka, głównie w połączeniu z lipoproteinami o wysokiej gęstości (HDL) oraz albuminami. Zewnątrzkomórkowy mechanizm działania S1P na komórki polega na wiązaniu się tej cząsteczki z grupą swoistych receptorów błonowych sprzężonych z białkiem G (S1PR1–S1PR5), natomiast wewnątrzkomórkowo S1P działa jako przekaźnik drugiego rzędu.

Dane literaturowe dowodzą, iż S1P pełni istotną rolę w czynności mięśni szkieletowych oraz zaangażowany jest w zmiany adaptacyjne zachodzące w następstwie wysiłku. Przede wszystkim zidentyfikowano go jako czynnik promujący regenerację mięśni poprzez aktywację komórek satelitarnych oraz stymulację różnicowania mioblastów. Wewnątrzkomórkowo S1P opóźnia rozwój zmęczenia mięśni, a efekt ten prawdopodobnie wiąże się z faktem, iż S1P wpływa na sprzężenie elektromechaniczne w miocytach na poziomie receptora rianodynowego regulując w ten sposób uwalnianie  $Ca^{2+}$  z cystern brzeżnych siateczki sarkoplazmatycznej. Prowadzone na przestrzeni ostatnich dwóch dekad badania wykazały, że aktywność fizyczna ma znaczący wpływ na metabolizm S1P zarówno we krwi, jak i w mięśniach szkieletowych. Co więcej, zaobserwowano, iż wykorzystywana w protokołach treningowych hipoksja również jest jednym z czynników stymulujących produkcję S1P.

Pomimo licznych badań mechanizmy odpowiedzialne za korzystny wpływ wysiłku wysokogórskiego na wydolność fizyczną organizmu pozostają w znacznej części niejasne.

W związku z powyższym, celem niniejszej pracy było ustalenie wpływu hipoksji normobarycznej na powysiłkowe zmiany S1P we krwi kolarzy.

Badaniem objęto 15 wykwalifikowanych kolarzy w wieku  $25,4 \pm 8,4$  lat. Uczestnicy zostali poddani dwóm rodzajom jednorazowego wysiłku fizycznego tj. wysiłek o wzrastającym obciążeniu, aż do wyczerpania (GE, *ang. graded exercise*) oraz symulowana 30km kolarska próba czasowa (TT, *ang. time trial*). Oba powyższe testy zostały przeprowadzone w warunkach normoksji i hipoksji normobarycznej ( $FiO_2=16,5\%$  co odpowiada  $\sim 2000$  m n.p.m.) w sali wyposażonej w system umożliwiający regulację procentowej zawartości tlenu w powietrzu. Próbkę krwi zostały pobrane w trzech punktach czasowych tj.: przed rozpoczęciem wysiłku, natychmiast po jego zakończeniu oraz po 30-minutowym odpoczynku. Ocenę zawartości S1P, dihydrosfingozyno-1-fosforanu (dhS1P), sfingozyny (SFO), dihydrosfingozyny (dhSFO), ceramidu (CER) i dihydroceramidu (dhCER) we krwi przeprowadzono metodą ultrasprawną chromatografię cieczową (UPLC). Analizę zawartości sfingomieliny (SM) w erytrocytach i płytkach krwi wykonano metodą chromatografii gazowo-cieczowej (GLC).

Z przeprowadzonych badań wynika, iż intensywny wysiłek fizyczny, aż do wyczerpania w warunkach normoksji spowodował istotny statystycznie wzrost stężenia osoczowego S1P oraz jego frakcji połączonej z HDL. Efekt ten nie został zaobserwowany w warunkach wysokogórskich, co więcej zaobserwowano zmniejszenie stężenia S1P i sfingomieliny w erytrocytach po zakończeniu wysiłku. Jednakże, po 30 minutowym odpoczynku stwierdzono wzrost S1P i SM w erytrocytach w porównaniu do wartości powysiłkowej. W symulowanej 30km kolarskiej próbie czasowej zaobserwowano istotne statystycznie powysiłkowe zmniejszenie stężenia osoczowego S1P, co więcej nasilenie tego efektu wykazano w warunkach hipoksji. Ponadto, w wyniku przeprowadzenia próby czasowej stwierdzono powysiłkowy wzrost stężenia dihydrosfingozyny i dhS1P zarówno w osoczu, jak i w połączeniu z HDL oraz z albuminami, a także w erytrocytach i płytkach krwi w porównaniu do stężenia początkowego. Dostępność tlenu nie miała wpływu na powyższe efekty.

Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, iż w wyniku długotrwałego wysiłku o charakterze tlenowym dochodzi do wzrostu stężeń dihydrosfingozyno-1-fosforanu w osoczu, zarówno w połączeniu z HDL, jak i albuminami, będącego konsekwencją nasilenia produkcji i uwalniania tego związku w erytrocytach. Zmiany w zawartości dhS1P w poszczególnych frakcjach zaobserwowano niezależnie od warunków tlenowych. Pojedynczy wysiłek fizyczny o wysokiej intensywności przeprowadzony w prawidłowych warunkach tlenowych spowodował wzrost osoczowego S1P w połączeniu z HDL. Jednakże, hipoksja zapobiegła wzrostowi stężenia sfingozyno-1-fosforanu w osoczu w następstwie pojedynczego

wysiłku fizycznego o charakterze beztlenowym, co może wynikać z redukcji zawartości S1P w erytrocytach.

## 11. Streszczenie w języku angielskim

The exposure of the body to hypoxic conditions results in the activation of numerous adaptive processes that lead to an increase in physical performance. Hence, this method has been widely used by athletes for years to improve performance in endurance sports. The beneficial effects resulting from the exposure of body to hypoxia include increased blood oxygen capacity, mitochondrial density, muscle tissue capillarization, and increased activity of oxidative enzymes.

Sphingosine-1-phosphate (S1P) is a derivative of sphingolipids that are not only essential components of cell membranes but also biologically active lipid mediators involved in intracellular signaling. Platelets and erythrocytes are considered stores of S1P due to the high activity of sphingosine kinase, the enzyme responsible for the synthesis of S1P, and the low activity of enzymes implicated in the degradation of this compound. This lipid is found in high concentrations in human plasma, mainly bounded with high-density lipoproteins (HDL) and albumin. The extracellular mechanism of S1P action on cells involves the binding of this molecule to a group of specific G-protein-coupled membrane receptors (S1PR1–S1PR5), while intracellularly S1P acts as a second messenger.

Literature data demonstrate that S1P plays an important role in skeletal muscle function and is involved in adaptive changes following exercise. First of all, it has been identified as a factor that promotes muscle regeneration through the activation of satellite cells and the stimulation of myoblast differentiation. Intracellular S1P delays the development of muscle fatigue, and this effect is likely related to the fact that S1P affects excitation-contraction coupling in myocytes through the ryanodine receptor, thereby regulating  $Ca^{2+}$  release from the terminal cisternae of the sarcoplasmic reticulum. Studies conducted over the past two decades have shown that physical activity has a significant effect on S1P metabolism in both blood and skeletal muscle. Moreover, it has been revealed that hypoxia used in training protocols is also one of the factors stimulating S1P production.

Despite numerous studies, the mechanisms responsible for the beneficial effects of high-altitude exercise on physical performance remains unclear. Therefore, the present study aimed to determine the effect of normobaric hypoxia on post-exercise changes of S1P in the blood of cyclists.

The study included 15 skilled cyclists aged  $25.4 \pm 8.4$  years. The participants were subjected to two types of acute exercise, i.e., a graded exercise until volitional exhaustion (GE) and a simulated 30km cycling time trial (TT). Both of the above tests were carried out under normoxia and normobaric hypoxia ( $F_{iO_2}=16.5\%$  which corresponds to ~2,000 meters above sea level) in a room equipped with a system that allows adjustment of the percentage of oxygen in the air. Blood samples were taken at three time points, i.e.: before the start of exercise, immediately after the end of exercise, and after a 30-minute rest. The assessment of content of S1P, dihydrosphingosine-1-phosphate (dhS1P), sphingosine (SFO), dihydrosphingosine (dhSFO), ceramide (CER), and dihydroceramide (dhCER) in blood was carried out by ultraperformance liquid chromatography (UPLC). Sphingomyelin content in erythrocytes and platelets was analyzed by gas-liquid chromatography (GLC).

The study shows that maximal exercise under normoxic conditions caused a statistically significant increase in plasma S1P concentrations in conjunction with HDL. This effect was not revealed under high-altitude conditions; moreover, a decrease in S1P and sphingomyelin concentrations in erythrocytes was observed after exercise. However, an increment in S1P and SM in erythrocytes was demonstrated after a 30-minute rest compared to the post-exercise value. In a simulated 30km cycling time trial, a statistically significant post-exercise decrease in plasma S1P concentration was observed; moreover, this effect was enhanced under hypoxia. In addition, a post-exercise increase in the concentration of dihydrosphingosine and dhS1P, both in plasma and in combination with HDL and albumin, as well as in erythrocytes and platelets compared to baseline was presented following this submaximal exercise. Oxygen availability did not affect the above effects.

In summary, it can be concluded that prolonged aerobic exercise results in an increase in plasma concentrations of dihydrosphingosine-1-phosphate, both in combination with HDL and albumin, as a consequence of upgraded production and release of this compound in erythrocytes. The same pattern of changes in the dhS1P level was observed regardless of oxygen conditions. High-intensity acute exercise performed under normoxic conditions caused a rise in plasma S1P in combination with HDL. However, hypoxia prevents the increase in plasma S1P following a maximal exercise, which may be due to a reduction in S1P content in erythrocytes.

## 12. Oświadczenia współautorów

<b>Sphingosine-1-phosphate in acute exercise and training</b>		
<b>Autorzy</b>	<b>Udział w przygotowaniu publikacji</b>	<b>Udział (%)</b>
Katarzyna Hodun	Opracowanie koncepcji pracy, zebranie piśmiennictwa oraz napisanie pracy.	70%
Adrian Chabowski	Konsultacja merytoryczna w trakcie tworzenia manuskryptu.	10%
Marcin Baranowski	Ocena merytoryczna i korekta manuskryptu.	20%

<b>The effect of normobaric hypoxia on acute exercise-induced changes in blood sphingoid base-1-phosphates metabolism in cyclists</b>		
<b>Autorzy</b>	<b>Udział w przygotowaniu publikacji</b>	<b>Udział (%)</b>
Katarzyna Hodun	Przygotowanie materiału do badań, wykonanie analiz laboratoryjnych, opracowanie koncepcji pracy, zebranie piśmiennictwa, opracowanie wyników, przygotowanie rycin i napisanie manuskryptu.	60%
Miłosz Czuba	Rekrutacja uczestników badania oraz wykonanie testów wysiłkowych.	10%
Kamila Płoszczyca	Rekrutacja uczestników badania oraz wykonanie testów wysiłkowych.	10%
Jerzy Sadowski	Konsultacja merytoryczna w trakcie przeprowadzania eksperymentu.	2%
Józef Langfort	Współuczestnictwo w opracowaniu protokołu eksperymentalnego.	2%
Adrian Chabowski	Konsultacja merytoryczna w trakcie tworzenia manuskryptu.	2%
Marcin Baranowski	Opracowanie koncepcji pracy, zarządzanie projektem, ocena merytoryczna i korekta manuskryptu.	14%



Białystok, 18.08.2023

mgr Katarzyna Hodun  
Zakład Fizjologii  
Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii  
i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim  
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku  
ul. Jana Kilińskiego 1  
15-089 Białystok

#### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji: „Sphingosine-1-phosphate in acute exercise and training” autorów: Katarzyna Hodun, Adrian Chabowski, Marcin Baranowski, opublikowanej w *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej: „Wpływ hipoksji normobarycznej na powysiłkowe zmiany metabolizmu sfingozyno-1-fosforanu we krwi kolarzy” wyniósł 70% i polegał na opracowaniu koncepcji pracy, zebraniu piśmiennictwa i napisaniu manuskryptu.

Katarzyna Hodun

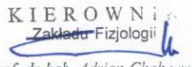
Białystok, 18.08.2023

prof. dr hab. Adrian Chabowski  
Zakład Fizjologii  
Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii  
i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim  
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku  
ul. Jana Kilińskiego 1  
15-089 Białystok

#### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji: „Sphingosine-1-phosphate in acute exercise and training” autorów: Katarzyna Hodun, Adrian Chabowski, Marcin Baranowski, opublikowanej w *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej: „Wpływ hipoksji normobarycznej na powysiłkowe zmiany metabolizmu sfingozyno-1-fosforanu we krwi kolarzy” wyniósł 10% i polegał na konsultacji merytorycznej w trakcie tworzenia manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie wyżej wymienionej publikacji przez mgr Katarzynę Hodun w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

KIEROWNI  
Zakład Fizjologii  
  
prof. dr hab. Adrian Chabowski

Białystok, 18.08.2023

prof. dr hab. Marcin Baranowski  
Zakład Fizjologii  
Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii  
i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim  
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku  
ul. Jana Kilińskiego 1  
15-089 Białystok

#### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji: „Sphingosine-1-phosphate in acute exercise and training” autorów: Katarzyna Hodun, Adrian Chabowski, Marcin Baranowski, opublikowanej w *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej: „Wpływ hipoksji normobarycznej na powysiłkowe zmiany metabolizmu sfingozyno-1-fosforanu we krwi kolarzy” wyniósł 20% i polegał na ocenie merytorycznej i korekcie manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie wyżej wymienionej publikacji przez mgr Katarzynę Hodun w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.



Białystok, 18.08.2023

mgr Katarzyna Hodun  
Zakład Fizjologii  
Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii  
i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim  
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku  
ul. Jana Kilińskiego 1  
15-089 Białystok

#### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji: „The effect of normobaric hypoxia on acute exercise-induced changes in blood sphingoid base-1-phosphates metabolism in cyclists” autorów: Katarzyna Hodun, Miłosz Czuba, Kamila Płoszczyca, Jerzy Sadowski, Józef Langfort, Adrian Chabowski, Marcin Baranowski, opublikowanej w *Biology of Sport*, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej: „Wpływ hipoksji normobarycznej na powysiłkowe zmiany metabolizmu sfingozyno-1-fosforanu we krwi kolarzy” wyniósł 60% i polegał na przygotowaniu materiału do badań, wykonaniu analiz laboratoryjnych, opracowaniu koncepcji pracy, zebraniu piśmiennictwa, opracowaniu wyników, przygotowaniu rycin i napisaniu manuskryptu.

Katarzyna Hodun

Warszawa, 18.08.2023

prof. dr hab. Miłosz Czuba  
Katedra Podstaw Fizjoterapii  
Wydział Rehabilitacji  
Akademia Wychowania Fizycznego Józefa Piłsudskiego  
ul. Marymoncka 34  
00-968 Warszawa

#### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji: „The effect of normobaric hypoxia on acute exercise-induced changes in blood sphingoid base-1-phosphates metabolism in cyclists” autorów: Katarzyna Hodun, Miłosz Czuba, Kamila Płoszczyca, Jerzy Sadowski, Józef Langfort, Adrian Chabowski, Marcin Baranowski, opublikowanej w *Biology of Sport*, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej: „Wpływ hipoksji normobarycznej na powysiłkowe zmiany metabolizmu sfingozyno-1-fosforanu we krwi kolarzy” wyniósł 10% i polegał na rekrutacji uczestników badania oraz wykonaniu testów wysiłkowych.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie wyżej wymienionej publikacji przez mgr Katarzynę Hodun w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.



Warszawa, 18.08.2023

dr Kamila Płoszczyca  
Zakład Kinezylogii  
Instytut Sportu – Państwowy Instytut Badawczy  
ul. Trylogii 2/16  
01-982 Warszawa

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji: „The effect of normobaric hypoxia on acute exercise-induced changes in blood sphingoid base-1-phosphates metabolism in cyclists” autorów: Katarzyna Hodun, Miłosz Czuba, Kamila Płoszczyca, Jerzy Sadowski, Józef Langfort, Adrian Chabowski, Marcin Baranowski, opublikowanej w *Biology of Sport*, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej: „Wpływ hipoksji normobarycznej na powysiłkowe zmiany metabolizmu sfingozyno-1-fosforanu we krwi kolarzy” wyniósł 10% i polegał na rekrutacji uczestników badania oraz wykonaniu testów wysiłkowych.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie wyżej wymienionej publikacji przez mgr Katarzynę Hodun w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.



Biała Podlaska, 18.08.2023

prof. dr hab. Jerzy Sadowski  
Zakład Nauki o Sporcie i Treningu  
Wydział Wychowania Fizycznego i Zdrowia  
Akademia Wychowania Fizycznego Józefa Piłsudskiego  
ul. Akademicka 2  
21-500 Biała Podlaska

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji: „The effect of normobaric hypoxia on acute exercise-induced changes in blood sphingoid base-1-phosphates metabolism in cyclists” autorów: Katarzyna Hodun, Miłosz Czuba, Kamila Płoszczyca, Jerzy Sadowski, Józef Langfort, Adrian Chabowski, Marcin Baranowski, opublikowanej w *Biology of Sport*, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej: „Wpływ hipoksji normobarycznej na powysiłkowe zmiany metabolizmu sfingozyno-1-fosforanu we krwi kolarzy” wyniósł 2% i polegał na konsultacji merytorycznej w trakcie przeprowadzania eksperymentu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie wyżej wymienionej publikacji przez mgr Katarzynę Hodun w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.



Katowice, 18.08.2023

prof. dr hab. Józef Langfort  
Katedra Teorii i Praktyki Sportu  
Wydział Wychowania Fizycznego  
Akademia Wychowania Fizycznego im. Jerzego Kukuczki  
ul. Mikołowska 72A  
40-065 Katowice

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji: „The effect of normobaric hypoxia on acute exercise-induced changes in blood sphingoid base-1-phosphates metabolism in cyclists” autorów: Katarzyna Hodun, Miłosz Czuba, Kamila Płoszczyca, Jerzy Sadowski, Józef Langfort, Adrian Chabowski, Marcin Baranowski, opublikowanej w *Biology of Sport*, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej: „Wpływ hipoksji normobarycznej na powysiłkowe zmiany metabolizmu sfingozyno-1-fosforanu we krwi kolarzy” wyniósł 2% i polegał na współuczestnictwie w opracowaniu protokołu eksperymentalnego.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie wyżej wymienionej publikacji przez mgr Katarzynę Hodun w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.




Białystok, 18.08.2023

prof. dr hab. Adrian Chabowski  
Zakład Fizjologii  
Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii  
i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim  
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku  
ul. Jana Kilińskiego 1  
15-089 Białystok

#### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji: „The effect of normobaric hypoxia on acute exercise-induced changes in blood sphingoid base-1-phosphates metabolism in cyclists” autorów: Katarzyna Hodun, Miłosz Czuba, Kamila Płoszczyca, Jerzy Sadowski, Józef Langfort, Adrian Chabowski, Marcin Baranowski, opublikowanej w *Biology of Sport*, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej: „Wpływ hipoksji normobarycznej na powysiłkowe zmiany metabolizmu sfingozyno-1-fosforanu we krwi kolarzy” wyniósł 2% i polegał na konsultacji merytorycznej w trakcie tworzenia manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie wyżej wymienionej publikacji przez mgr Katarzynę Hodun w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

KIEROWNIK  
Zakładu Fizjologii  
  
prof. dr hab. Adrian Chabowski

Białystok, 18.08.2023

prof. dr hab. Marcin Baranowski  
Zakład Fizjologii  
Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii  
i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim  
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku  
ul. Jana Kilińskiego 1  
15-089 Białystok

#### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji: „The effect of normobaric hypoxia on acute exercise-induced changes in blood sphingoid base-1-phosphates metabolism in cyclists” autorów: Katarzyna Hodun, Miłosz Czuba, Kamila Płoszczyca, Jerzy Sadowski, Józef Langfort, Adrian Chabowski, Marcin Baranowski, opublikowanej w *Biology of Sport*, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej: „Wpływ hipoksji normobarycznej na powysiłkowe zmiany metabolizmu sfingozyno-1-fosforanu we krwi kolarzy” wyniósł 14% i polegał na zarządzaniu projektem, opracowaniu koncepcji pracy, ocenie merytorycznej i korekcie manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie wyżej wymienionej publikacji przez mgr Katarzynę Hodun w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.



### **13. Uchwała komisji etycznej**

**KOMISJA BIOETYCZNA**  
**UNIwersYTETU MEDYCZNEGO w BIAŁYMSTOKU**  
ul. Jana Kilińskiego 1  
15-089 Białystok  
tel. (085) 748 54 07, (085) 686 52 20, fax. (085) 748 55 08  
prorektorkl@umb.edu.pl

---

Białystok, 27-06-2019

Uchwała nr: R-I-002/325/2019

Komisja Bioetyczna Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, po zapoznaniu się z projektem badania zgodnie z zasadami GCP/ Guidelines for Good Clinical Practice /- **w y r a ż a z g o d ę** na prowadzenie tematu badawczego: „Czy sfingozyno-1-fosforan jest jednym z czynników odpowiedzialnych za skuteczność treningu hipoksycznego?” przez prof. dr hab. Marcina Baranowskiego wraz z zespołem badawczym z UMB.

Z-ca Przewodniczącej Komisji Bioetycznej UMB

  
dr n. farm. Krzysztof Chrzanowski

## 14. Bibliografia

1. Girard, O.; Brocherie, F.; Millet, G.P. Effects of Altitude/Hypoxia on Single- and Multiple-Sprint Performance: A Comprehensive Review. *Sports Medicine* **2017**, *47*, 1931–1949, doi:10.1007/s40279-017-0733-z.
2. Czuba, M.; Fidos-Czuba, O.; Płoszczyca, K.; Zajac, A.; Langfort, J. Comparison of the Effect of Intermittent Hypoxic Training vs. the Live High, Train Low Strategy on Aerobic Capacity and Sports Performance in Cyclists in Normoxia. *Biology of Sport* **2018**, *35*, 39–48, doi:10.5114/biolSport.2018.70750.
3. Płoszczyca, K.; Langfort, J.; Czuba, M. The Effects of Altitude Training on Erythropoietic Response and Hematological Variables in Adult Athletes: A Narrative Review. *Frontiers in Physiology* **2018**, *9*, doi:10.3389/fphys.2018.00375.
4. Płoszczyca, K.; Czuba, M.; Chalimoniuk, M.; Gajda, R.; Baranowski, M. Red Blood Cell 2,3-Diphosphoglycerate Decreases in Response to a 30 Km Time Trial Under Hypoxia in Cyclists. *Frontiers in Physiology* **2021**, *12*, doi:10.3389/fphys.2021.670977.
5. Bailey, D.M.; Davies, B. Physiological Implications of Altitude Training for Endurance Performance at Sea Level: A Review. *International Journal of Heat Exchangers* **1997**, *31*, 183–190.
6. Sinex, J.A.; Chapman, R.F. Hypoxic Training Methods for Improving Endurance Exercise Performance. *Journal of Sport and Health Science* **2015**, *4*, 325–332, doi:10.1016/j.jshs.2015.07.005.
7. Coppel, J.; Hennis, P.; Gilbert-Kawai, E.; Grocott, M.P.W. The Physiological Effects of Hypobaric Hypoxia versus Normobaric Hypoxia: A Systematic Review of Crossover Trials. *Extreme Physiology and Medicine* **2015**, *4*, doi:10.1186/s13728-014-0021-6.
8. Townsend, N.E.; Gore, C.J.; Ebert, T.R.; Martin, D.T.; Hahn, A.G.; Chow, C.M. Ventilatory Acclimatisation Is Beneficial for High-Intensity Exercise at Altitude in Elite Cyclists. *European Journal of Sport Science* **2016**, *16*, 895–902, doi:10.1080/17461391.2016.1139190.
9. Blaho, V.A.; Hla, T. An Update on the Biology of Sphingosine 1-Phosphate Receptors. *Journal of Lipid Research* **2014**, *55*, 1596–1608, doi:10.1194/jlr.R046300.
10. Tukijan, F.; Chandrakanthan, M.; Nguyen, L.N. The Signalling Roles of Sphingosine-1-Phosphate Derived from Red Blood Cells and Platelets. *British Journal of*

- Pharmacology* **2018**, *175*, 3741–3746, doi:10.1111/bph.14451.
11. Thuy, A. V.; Reimann, C.M.; Hemdan, N.Y.A.; Gräler, M.H. Sphingosine 1-Phosphate in Blood: Function, Metabolism, and Fate. *Cellular Physiology and Biochemistry* **2014**, *34*, 158–171, doi:10.1159/000362992.
  12. Zanto, T.P.; Hennigan, K.; Östberg, M.; Clapp, W.C.; Gazzaley, A. Granule-Mediated Release of Sphingosine-1-Phosphate by Activated Platelets. *Biochimica et Biophysica Acta* **2014**, *1841*, 1581–1589, doi:10.1016/j.cortex.2009.08.003.Predictive.
  13. Hisano, Y.; Kobayashi, N.; Yamaguchi, A.; Nishi, T. Mouse SPNS2 Functions as a Sphingosine-1-Phosphate Transporter in Vascular Endothelial Cells. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e38941, doi:10.1371/journal.pone.0038941.
  14. Hanel, P.; Paul, A.; Graler, M.H. Erythrocytes Store and Release Sphingosine 1-Phosphate in Blood. *FASEB Journal* **2007**, *21*, 1202–1209, doi:10.1096/fj.06-7433com.
  15. Ohkawa, R.; Nakamura, K.; Okubo, S.; Hosogaya, S.; Ozaki, Y.; Tozuka, M.; Osima, N.; Yokota, H.; Ikeda, H.; Yatomi, Y. Plasma Sphingosine-1-Phosphate Measurement in Healthy Subjects: Close Correlation with Red Blood Cell Parameters. *Annals of Clinical Biochemistry* **2008**, *45*, 356–363, doi:10.1258/acb.2007.007189.
  16. Książek, M.; Chacińska, M.; Chabowski, A.; Baranowski, M. Sources, Metabolism, and Regulation of Circulating Sphingosine-1-Phosphate. *Journal of Lipid Research* **2015**, *56*, 1271–1281, doi:10.1194/jlr.R059543.
  17. Nishi, T.; Kobayashi, N.; Hisano, Y.; Kawahara, A.; Yamaguchi, A. Molecular and Physiological Functions of Sphingosine 1-Phosphate Transporters. *Biochimica et Biophysica Acta- Molecular and Cell Biology of Lipids* **2014**, *1841*, 759–765, doi:10.1016/j.bbalip.2013.07.012.
  18. Vu, T.M.; Ishizu, A.N.; Foo, J.C.; Toh, X.R.; Zhang, F.; Whee, D.M.; Torta, F.; Cazenave-Gassiot, A.; Matsumura, T.; Kim, S.; et al. Mfsd2b Is Essential for the Sphingosine-1-Phosphate Export in Erythrocytes and Platelets. *Nature* **2017**, *550*, 524–528, doi:10.1038/nature24053.
  19. Książek, M.; Charmas, M.; Klusiewicz, A.; Zabielski, P.; Długołęcka, B.; Chabowski, A.; Baranowski, M. Endurance Training Selectively Increases High-Density Lipoprotein-Bound Sphingosine-1-Phosphate in the Plasma. *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports* **2018**, *28*, 57–64, doi:10.1111/sms.12910.
  20. Fyrst, H.; Saba, J.D. An Update on Sphingosine-1-Phosphate and Other Sphingolipid Mediators. *Nature Chemical Biology* **2010**, *6*, 489–497, doi:10.1038/nchembio.392.An.

21. Liu, X.; Zhang, Q.H.; Yi, G.H. Regulation of Metabolism and Transport of Sphingosine-1-Phosphate in Mammalian Cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* **2012**, *363*, 21–33, doi:10.1007/s11010-011-1154-1.
22. Pappu, R.; Schwab, S.R.; Cornelissen, I.; Pereira, J.P.; Regard, J.B.; Xu, Y.; Camerer, E.; Zheng, Y.W.; Huang, Y.; Cyster, J.G.; et al. Promotion of Lymphocyte Egress into Blood and Lymph by Distinct Sources of Sphingosine-1-Phosphate. *Science* **2007**, *316*, 295–298, doi:10.1126/science.1139221.
23. Germinario, E.; Peron, S.; Toniolo, L.; Betto, R.; Cencetti, F.; Donati, C.; Bruni, P.; Danieli-Betto, D. S1P2 Receptor Promotes Mouse Skeletal Muscle Regeneration. *Journal of Applied Physiology* **2012**, *113*, 707–713, doi:10.1152/jappphysiol.00300.2012.
24. Donati, C.; Meacci, E.; Nuti, F.; Becciolini, L.; Farnararo, M.; Bruni, P. Sphingosine 1-Phosphate Regulates Myogenic Differentiation: A Major Role for S1P2 Receptor. *FASEB Journal* **2005**, *19*, 449–451, doi:10.1096/fj.04-1780fje.
25. Nagata, Y.; Partridge, T.A.; Matsuda, R.; Zammit, P.S. Entry of Muscle Satellite Cells into the Cell Cycle Requires Sphingolipid Signaling. *Journal of Cell Biology* **2006**, *174*, 245–253, doi:10.1083/jcb.200605028.
26. Ieronimakis, N.; Pantoja, M.; Hays, A.L.; Dosey, T.L.; Qi, J.; Fischer, K.A.; Hoofnagle, A.N.; Sadilek, M.; Chamberlain, J.S.; Ruohola-Baker, H.; et al. Increased Sphingosine-1-Phosphate Improves Muscle Regeneration in Acutely Injured Mdx Mice. *Skeletal Muscle* **2013**, *3*, 20, doi:10.1186/2044-5040-3-20.
27. Bencini, C.; Squecco, R.; Piperio, C.; Formigli, L.; Meacci, E.; Nosi, D.; Tiribilli, B.; Vassalli, M.; Quercioli, F.; Bruni, P.; et al. Effects of Sphingosine 1-Phosphate on Excitation-Contraction Coupling in Mammalian Skeletal Muscle. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* **2003**, *24*, 539–554, doi:10.1023/B:JURE.00000009898.02325.58.
28. Strub, G.M.; Paillard, M.; Liang, J.; Gomez, L.; Allegood, J.C.; Hait, N.C.; Maceyka, M.; Price, M.M.; Chen, Q.; Simpson, D.C.; et al. Sphingosine-1-Phosphate Produced by Sphingosine Kinase 2 in Mitochondria Interacts with Prohibitin 2 to Regulate Complex IV Assembly and Respiration. *The FASEB Journal* **2011**, *25*, 600–612, doi:10.1096/fj.10-167502.
29. Nguyen-Tran, D.H.; Hait, N.C.; Sperber, H.; Qi, J.; Fischer, K.; Ieronimakis, N.; Pantoja, M.; Hays, A.; Allegood, J.; Reyes, M.; et al. Molecular Mechanism of Sphingosine-1-Phosphate Action in Duchenne Muscular Dystrophy. *DMM Disease*

- Models and Mechanisms* **2014**, 7, 41–54, doi:10.1242/dmm.013631.
30. Shen, Z.; Liu, C.; Liu, P.; Zhao, J.; Xu, W. Sphingosine 1-Phosphate (S1P) Promotes Mitochondrial Biogenesis in Hep G2 Cells by Activating Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  Coactivator 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ). *Cell Stress and Chaperones* **2014**, 19, 541–548, doi:10.1007/s12192-013-0480-5.
  31. Cordeiro, A. V.; Silva, V.R.R.; Pauli, J.R.; da Silva, A.S.R.; Cintra, D.E.; Moura, L.P.; Ropelle, E.R. The Role of Sphingosine-1-Phosphate in Skeletal Muscle: Physiology, Mechanisms, and Clinical Perspectives. *Journal of Cellular Physiology* **2019**, 234, 10047–10059, doi:10.1002/jcp.27870.
  32. Donati, C.; Cencetti, F.; Bruni, P.; Sharples, A.P. Sphingosine 1-Phosphate Axis: A New Leader Actor in Skeletal Muscle Biology. *Frontiers in Physiology* **2013**, 4, 338, doi:10.3389/fphys.2013.00338.
  33. Baranowski, M.; Charmas, M.; Górski, J. Exercise Increases Plasma Levels of Sphingoid Base-1 Phosphates in Humans. *Acta Physiologica* **2011**, 203, 373–380, doi:10.1111/j.1748-1716.2011.02322.x.
  34. Baranowski, M.; Błachnio-Zabielska, A.U.; Charmas, M.; Helge, J.W.; Dela, F.; Książek, M.; Długołęcka, B.; Klusiewicz, A.; Chabowski, A.; Górski, J. Exercise Increases Sphingoid Base-1-Phosphate Levels in Human Blood and Skeletal Muscle in a Time- and Intensity-Dependent Manner. *European Journal of Applied Physiology* **2015**, 115, 993–1003, doi:10.1007/s00421-014-3080-x.
  35. Karliner, J.S. Sphingosine Kinase and Sphingosine 1-Phosphate in the Heart: A Decade of Progress. *Biochimica et Biophysica Acta* **2013**, 1831, 203–212, doi:10.1016/j.bbali.2012.06.006.Sphingosine.
  36. Poti, F.; Simoni, M.; Nofer, J.-R. Atheroprotective Role Of high-Density Lipoprotein (HDL)-Associated Sphingosine-1-Phosphate (S1P). *Cardiovascular Research* **2014**, 103, 395–404, doi:10.1093/cvr/cvu136.
  37. Sun, K.; Zhang, Y.; Alessandro, A.D.; Nemkov, T.; Song, A.; Wu, H.; Liu, H.; Adebiyi, M.; Huang, A.; Wen, Y.E.; et al. Sphingosine-1-Phosphate Promotes Erythrocyte Glycolysis and Oxygen Release for Adaptation to High-Altitude Hypoxia. *Nature Publishing Group* **2016**, 7, 12086, doi:10.1038/ncomms12086.
  38. Semenza, G.L. Regulation of Oxygen Homeostasis by Hypoxia-Inducible Factor 1. *Physiology* **2009**, 24, 97–106, doi:10.1152/physiol.00045.2008.
  39. Kalhori, V.; Kempainen, K.; Asghar, M.Y.; Bergelin, N.; Jaakkola, P. Sphingosine-1-Phosphate as a Regulator of Hypoxia- Induced Factor-1  $\alpha$  in Thyroid Follicular



- Carcinoma Cells. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e66189, doi:10.1371/journal.pone.0066189.
40. Chawla, S.; Rahar, B.; Saxena, S. S1P Prophylaxis Mitigates Acute Hypobaric Hypoxia-Induced Molecular, Biochemical, and Metabolic Disturbances: A Preclinical Report. *IUBMB Life* **2016**, *68*, 365–375, doi:10.1002/iub.1489.
41. Moon, M.H.; Jeong, J.K.; Lee, Y.J.; Seol, J.W.; Park, S.Y. Sphingosine-1-Phosphate Inhibits Interleukin-1 $\beta$ -Induced Inflammation in Human Articular Chondrocytes. *International Journal of Molecular Medicine* **2012**, *30*, 1451–1458, doi:10.3892/ijmm.2012.1135.
42. Obinata, H.; Hla, T. Sphingosine 1-Phosphate and Inflammation. *International Immunology* **2019**, *31*, 617–625, doi:10.1093/intimm/dxz037.