

**Akademia Wychowania Fizycznego  
im. Polskich Olimpijczyków we Wrocławiu**  
51-612 Wrocław, al. I. J. Paderewskiego 35  
za pośrednictwem:  
**Rady Doskonałości Naukowej**  
pl. Defilad 1  
00-901 Warszawa  
(Pałac Kultury i Nauki, p. XXIV, pok. 2401)

Dr inż. Anna Książek  
Akademia Wychowania Fizycznego  
im. Polskich Olimpijczyków we Wrocławiu

## **Wniosek**

z dnia 15.12.2023 r.

o przeprowadzenie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego  
w **dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauk o kulturze  
fizycznej.**<sup>1</sup>

Określenie osiągnięcia naukowego będącego podstawą ubiegania się o nadanie  
stopnia doktora habilitowanego. Cykl 4 publikacji naukowych pt.:

### **„Trening sportowy a stężenie metabolitów witaminy D u młodych mężczyzn”**

Wniosuję – na podstawie art. 221 ust. 10 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo  
o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 zm.) – aby komisja habilitacyjna  
podejmowała uchwałę w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w głosowaniu  
**tajnym/jawnym**\*<sup>2</sup>

*Zostałem poinformowany, że:*

*Administratorem w odniesieniu do danych osobowych pozyskanych w ramach postępowania  
w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego jest Przewodniczący Rady Doskonałości  
Naukowej z siedzibą w Warszawie (pl. Defilad 1, XXIV piętro, 00-901 Warszawa).*

*Kontakt za pośrednictwem e-mail: [kancelaria@rdn.gov.pl](mailto:kancelaria@rdn.gov.pl), tel. 22 656 60 98 lub w siedzibie organu.  
Dane osobowe będą przetwarzane w oparciu o przesłankę wskazaną w art. 6 ust. 1 lit. c)  
Rozporządzenia UE 2016/679 z dnia z dnia 27 kwietnia 2016 r. w związku z art. 220 - 221 oraz art.  
232 – 240 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, w celu  
przeprowadzenie postępowania o nadanie stopnia doktora habilitowanego oraz realizacji praw  
i obowiązków oraz środków odwoławczych przewidzianych w tym postępowaniu.*

*Szczegółowa informacja na temat przetwarzania danych osobowych w postępowaniu dostępna jest  
na stronie [www.rdn.gov.pl/klauzula-informacyjna-rodz.html](http://www.rdn.gov.pl/klauzula-informacyjna-rodz.html)*



<sup>1</sup> Klasyfikacja dziedzin i dyscyplin wg. rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 20 września 2018 r. w sprawie dziedzin nauki i dyscyplin naukowych oraz dyscyplin w zakresie sztuki (Dz. U. z 2018 r. poz. 1818).

<sup>2</sup> \* Niepotrzebne skreślić.

Załączniki:

1. Dane wnioskodawcy.
2. Kopia dokumentu potwierdzającego posiadanie stopnia naukowego doktora.
3. Autoreferat dorobku naukowego.
4. Wykaz osiągnięć naukowych i analiza naukometryczna.
5. Potwierdzenie danych naukometrycznych przez Ośrodek Informacji Naukowej AWF im. Polskich Olimpijczyków we Wrocławiu.
6. Oświadczenia współautorów o merytorycznym wkładzie w powstawanie prac wchodzących w skład osiągnięcia.
7. Kopie artykułów naukowych stanowiących jednotematyczny cykl prac.
8. Potwierdzenie realizacji staży oraz otrzymania grantów naukowych.

# AKADEMIA WYCHOWANIA FIZYCZNEGO WE WROCŁAWIU

## WYDZIAŁ NAUK O SPORCIE



WYDANY W RZECZYPOSPOLITEJ POLSKIEJ

# DYPLOM

## Anna Książek

urodzona dnia 26 czerwca 1989 r. w Bielsku-Białej

na podstawie przedstawionej rozprawy doktorskiej

Stężenie 25(OH)D a wybrane elementy sprawności motorycznej i sztywność mięśni u sportowców.

oraz po złożeniu wymaganych egzaminów uzyskała stopień naukowy

# DOKTORA

## NAUK O KULTURZE FIZYCZNEJ

nadany uchwałą Rady Wydziału Nauk o Sporcie

z dnia 17 maja 2018 r.

Promotor w przewodzie  
doktorskim

prof. dr hab. Małgorzata Słowińska-Lisowska

Recenzenci w przewodzie  
doktorskim

prof. dr hab. Jędrzej Antosiewicz

prof. dr hab. Maciej Pawlak

Wrocław, 28 września 2018 r.



PODPIS ZAUFANY

ANNA  
KSIĄŻEK  
14.12.2023 17:55:57 [GMT+1]  
Dokument podpisany elektronicznie  
podpisem zaufanym

  
(podpis promotora)

DZIEKAN  
Wydziału Nauk o Sporcie  
(pieczęć imienna i podpis dziekana)  
  
dr hab. Tadeusz Stefaniak,  
prof. AWF Wrocław

REKTOR  
  
dr hab. Andrzej Rokita  
(pieczęć imienna i podpis rektora)



## Wydział Nauk o Sporcie

dr hab. Tadeusz Stefaniak, prof. AWF  
Dziekan

Akademia Wychowania Fizycznego  
we Wrocławiu  
al. I.J. Paderewskiego 35  
51-612 Wrocław  
www.awf.wroc.pl

DN: 4000.4/2018

Wrocław, dnia 18.05.2018

Szanowna Pani  
dr Anna Książek  
Katedra Biologicznych  
i Motorycznych Podstaw Sportu

Uprzejmie informuję, że Rada Wydziału Nauk o Sporcie Akademii Wychowania Fizycznego we Wrocławiu na posiedzeniu w dniu 17 maja 2018 r. podjęła uchwałę w sprawie

### nadania Pani stopnia doktora nauk o kulturze fizycznej

oraz o wyróżnieniu Pani rozprawy doktorskiej pod tytułem: „Stężenie 25(OH)D a wybrane elementy sprawności motorycznej i sztywność mięśni u sportowców”.

Z wyrazami szacunku

DZIEKAN  
Wydziału Nauk o Sporcie

  
dr hab. Tadeusz Stefaniak,  
prof. AWF Wrocław



PODPIS ZAUFANY

ANNA  
KSIĄŻEK

14.12.2023 17:58:20 [GMT+1]

Dokument podpisany elektronicznie  
podpisem zaufanym

#### Do wiadomości:

- Prorektor ds. Nauczania
- Kierownik Katedry
- Dział Spraw Pracowniczych i Płac
- Biblioteka Główna AWF – Ośrodek Informacji Naukowej
- a/a

**Anna Książek**

**Autoreferat**

**Opisujący osiągnięcia i dorobek naukowy**

**Wrocław 2023**

**Spis treści**

1. Imię i nazwisko .....	3
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca oraz roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.....	3
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.....	4
4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.) .....	5
4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego .....	5
4.2. Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe.....	5
4.3. Omówienie celu naukowego ww. cyklu prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania .....	7
4.4. Cele wskazane w cyklu publikacji.....	15
4.5. Omówienie realizacji celów w poszczególnych pracach .....	16
4.6. Podsumowanie – wkład cyklu prac w dziedzinę nauk medycznych i nauk o zdrowiu (przekaz naukowy i aplikacyjny omawianych prac) .....	25
5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych .....	33
5.1. Prace opublikowane przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora .....	33
5.2. Prace opublikowane po uzyskaniu stopnia naukowego doktora .....	35
6. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej, w szczególności zagranicznej .....	38
6.1. Udział w stażach krajowych i zagranicznych .....	38
6.2. Czynny udział w konferencjach naukowych.....	40
6.3. Kierownictwo oraz wykonawstwo w projektach naukowych .....	40
6.4. Recenzje dla międzynarodowych czasopism naukowych .....	42
7. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę .....	42
7.1. Osiągnięcia dydaktyczne i organizacyjne.....	42
7.2. Rozdziały (książek/monografii) .....	43
7.3. Osiągnięcia popularyzujące naukę .....	45
7.4. Nagrody oraz wyróżnienia.....	45
7.5. Członkostwo w międzynarodowych towarzystwach naukowych .....	46
8. Dodatkowe informacje dotyczące kariery naukowej i zawodowej.....	46
8.1. Praca zawodowa w ramach opieki dietetycznej w klubie sportowym .....	46



PODPIS ZAUFANY

ANNA  
KSIĄŻEK

15.12.2023 07:56:34 [GMT+1]

Dokument podpisany elektronicznie  
podpisem zaufanym

**1. Imię i nazwisko**

Anna Książek

Nr ORCID: 0000-0002-6677-5920

**2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca oraz roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej**

**2018** – Uzyskanie stopnia doktora nauk o kulturze fizycznej

Wydział Nauk o Sporcie

Akademia Wychowania Fizycznego we Wrocławiu

Tytuł rozprawy doktorskiej: „Stężenie 25(OH)D a wybrane elementy sprawności motorycznej i sztywność mięśni u sportowców”

Rozprawa doktorska została wyróżniona

**2012 – 2013** – Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Wydział Nauk o Żywności

Kierunek: Technologia Żywności i Żywnienie Człowieka

Specjalizacja: Technologia Żywności

Studia magisterskie, stacjonarne

**2010 – 2013** – Akademia Wychowania Fizycznego we Wrocławiu

Wydział Nauk o Sporcie

Kierunek: Sport

Specjalizacja: Trener

Studia licencjackie, stacjonarne

**2008 – 2012** – Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Wydział Nauk o Żywności

Kierunek: Technologia Żywności i Żywnienie Człowieka

Studia inżynierskie, stacjonarne

**Dodatkowe kwalifikacje i uprawnienia:**

Trener II klasy – Judo (2013)

Stopień mistrzowski II dan – Judo (2013)

### **3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych**

**01.10.2018 – obecnie** – Adiunkt w grupie pracowników badawczo-dydaktycznych  
Akademia Wychowania Fizycznego im. Polskich Olimpijczyków we Wrocławiu  
Wydział Wychowania Fizycznego i Sportu  
Zakład Biologicznych i Medycznych Podstaw Sportu

**01.10.2014 – 30.09.2018** – Asystent  
Akademia Wychowania Fizycznego we Wrocławiu  
Wydział Nauk o Sporcie  
Katedra Biologicznych i Motorycznych Podstaw Sportu  
Zakład Medycyny Sportowej i Dietetyki

#### **Zatrudnienie w klubach sportowych oraz kadrach narodowych w ramach opieki dietetycznej:**

<b>01.09.2014 – obecnie</b>	Klub piłkarski MKS „Miedź” Legnica
<b>01.11.2017 – 31.12.2017</b>	Kadra Narodowa Seniorek Judo
<b>01.05.2014 – 30.06.2018</b>	Akademia Piłkarska MKS „Miedź” Legnica



**4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.)**

Osiągnięciem naukowym, będącym podstawą do ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego na podstawie art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.) jest monotematyczny cykl 4 prac naukowych, opublikowanych w międzynarodowych czasopismach w latach 2019 – 2023. W każdej publikacji jestem pierwszym autorem, autorem korespondencyjnym oraz mój udział był wiodący na każdym etapie przygotowania prac.

Dla wskazanego cyklu artykułów sumaryczny wskaźnik Impact Factor (IF) wynosi **17,546**, a łączna liczba punktów, zgodnie z punktacją Ministerstwa Edukacji i Nauki (MEiN) wynosi **440**.

Oświadczenia współautorów o merytorycznym wkładzie w powstawanie publikacji wchodzących w skład osiągnięcia zamieszczono w załączniku nr 6.

**4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego**

*„Trening sportowy a stężenie metabolitów witaminy D u młodych mężczyzn”*

**4.2. Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe**

**Publikacja 1.**

**Książek A, Zagrodna A, Słowińska-Lisowska M.** Vitamin D, Skeletal Muscle Function and Athletic Performance in Athletes – A Narrative Review. *Nutrients*. 2019; 11(8):1800. doi: 10.3390/nu11081800.

**IF: 4,546**

**MEiN: 140 pkt.**

**Cytowania: 53\***

\*(Dane z Web of Science na dzień 15.12.2023)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: tworzeniu koncepcji, sformułowaniu celów naukowych, zgromadzeniu piśmiennictwa, analizie danych z piśmiennictwa, przygotowaniu manuskryptu oraz uczestnictwie w korekcie artykułu po złożeniu manuskryptu do druku.

**Publikacja 2.**

**Książek A**, Zagrodna A, Słowińska-Lisowska M, Lombardi G. Relationship Between Metabolites of Vitamin D, Free 25-(OH)D, and Physical Performance in Indoor and Outdoor Athletes. *Front Physiol.* 2022; 8;13:909086. doi: 10.3389/fphys.2022.909086.

**IF: 4,000****MEiN: 100 pkt.****Cytowania: 5**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: tworzeniu koncepcji projektu badawczego, wyborze metod badawczych, realizacji eksperymentu badawczego, tworzeniu bazy danych, analizie i interpretacji wyników badań, przygotowaniu manuskryptu oraz uczestnictwie w korekcie artykułu po złożeniu manuskryptu do druku.

**Publikacja 3.**

**Książek A**, Zagrodna A, Lombardi G, Słowińska-Lisowska M. Metabolism of vitamin D is not affected by sport activity. *Clin Chim Acta.* 2023; 548:117507. doi: 10.1016/j.cca.2023.117507.

**IF: 5,000****MEiN: 100 pkt.**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: tworzeniu koncepcji projektu badawczego, wyborze metod badawczych, realizacji eksperymentu badawczego, tworzeniu bazy danych, analizie i interpretacji wyników badań, przygotowaniu manuskryptu oraz uczestnictwie w korekcie artykułu po złożeniu manuskryptu do druku.

**Publikacja 4.**

**Książek A**, Zagrodna A, Lombardi G, Słowińska-Lisowska M. Seasonal changes in free 25-(OH)D and vitamin D metabolite ratios and their relationship with psychophysical stress markers in male professional football players. *Front Physiol.* 2023. 16;14:1258678. doi: 10.3389/fphys.2023.1258678.

**IF: 4,000****MEiN: 100 pkt.**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: tworzeniu koncepcji projektu badawczego, wyborze metod badawczych, realizacji eksperymentu badawczego, tworzeniu bazy danych, analizie i interpretacji wyników badań, przygotowaniu

manuskryptu oraz uczestnictwie w korekcie artykułu po złożeniu manuskryptu do druku.

#### **4.3. Omówienie celu naukowego ww. cyklu prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania**

Uzasadnienie podjęcia problemu badawczego w ramach realizacji jednotematycznego cyklu czterech artykułów naukowych pod wspólnym tytułem „*Trening sportowy a stężenie metabolitów witaminy D u młodych mężczyzn*”.

##### **Metabolizm witaminy D**

Pod względem chemicznym witamina D została włączona do grupy związków sekosteroidowych, ponieważ charakteryzuje się otwartym pierścieniem B. Poszczególne metabolity znacznie różnią się od siebie pod względem stężenia w surowicy i aktywności biologicznej (Alonso i wsp., 2022). Prekursorami witaminy D są związki pochodzenia zwierzęcego – cholekalcyferol (witamina D<sub>3</sub>) oraz występujący w grzybach i drożdżach – ergokalcyferol (witamina D<sub>2</sub>). Różnica między nimi polega na obecności podwójnego wiązania pomiędzy atomami węgla 22 i 23 oraz grupy metylowej połączonej z atomem węgla 24 (Holick 2002). Witamina D<sub>3</sub>, która powstaje w keratynocytach z 7-dehydrocholesterolu w wyniku ekspozycji komórek naskórka na promieniowanie ultrafioletowe, stanowi około 90% całej puli witaminy D w organizmie. Może być także dostarczana z pożywieniem pochodzenia zwierzęcego. Witamina D<sub>2</sub> jest z kolei pozyskiwana wyłącznie ze źródeł egzogennych. Produkty spożywcze, takie jak tłuste ryby, olej z wątroby oraz żółtko jaja, zawierają witaminę D<sub>2</sub> i D<sub>3</sub>. Z tego względu pożywienie przyczynia się do pokrycia zapotrzebowania na witaminę D w 10 – 20% (Alonso i wsp., 2022).

Krążące witaminy D<sub>2</sub> i D<sub>3</sub> biorą udział w przemianach metabolicznych podlegając dwustopniowej aktywacji, zachodzącej w wątrobie i nerkach. Prowitamina D w połączeniu z białkiem wiążącym witaminę D (VDPB, ang. *vitamin D binding protein*) jest transportowana do wątroby, gdzie ulega pierwszej hydroksylacji (Makris i wsp., 2020b). Proces ten katalizowany jest przez 25-hydroksylazę witaminy D zależną od cytochromu P450, dzięki obecności odpowiednich enzymów: CYP2R1 (mikrosomalny) i CYP27A1 (mitochondrialny). W wyniku tego procesu powstaje 25-hydroksycholekalcyferol (kalcydiol, 25-(OH)D), metabolit witaminy D o największym stężeniu we krwi, który jest

nieaktywny biologicznie. Następnie przy udziale VDBP 25-hydroksycholekalcyferol jest transportowany do kanalików proksymalnych nerek. Tam bierze udział w procesie  $1\alpha$ -hydroksylacji pierścienia A kalcydiolu przy udziale  $1\alpha$ -hydroksylazy (CYP27B1). Nerkowy CYP27B1 przyłącza drugą grupę hydroksylową w pozycji 1, tworząc aktywny biologicznie związek kalcytriol ( $1\alpha,25$ -dihydroksycholekalcyferol,  $1,25$ -(OH) $_2$ D) (Jones i wsp., 2014). Aktywacja kalcytriolu w kanalikach nerkowych jest ściśle regulowana, między innymi przez stężenie wapnia, fosforanów, parathormonu (PTH) oraz czynnika wzrostu fibroblastów 23 (FGF23). Aktywność kalcytriolu jest 1000-krotnie wyższa niż kalcydiolu, ale jego okres półtrwania jest krótszy od kalcydiolu i wynosi od 4 do 6 godzin. Oprócz nerek, CYP27B1 ulega również ekspresji w wielu innych narządach, co powoduje, że  $1,25$ -(OH) $_2$ D może być produkowany przez większość tkanek (Herrmann i wsp., 2017). Dzięki temu miejscowo syntetyzowana, aktywna biologicznie forma witaminy D drogą regulacji autokrynnej i parakrynnej, wpływa na procesy fizjologiczne w miejscach jej syntezy (Alonso i wsp., 2022).

#### **Znaczenie biologiczne kalcytriolu ( $1,25$ -(OH) $_2$ D)**

Kalcytriol odzwierciedla przede wszystkim produkcję nerkową. Tymczasem wiele innych komórek i tkanek (takich jak monocyty, makrofagi, komórki dendrytyczne, osteoblasty, keratynocyty, a także miocyty) wykazuje ekspresję  $1\alpha$ -hydroksylazy, a tym samym zdolność do lokalnego wytwarzania  $1,25$ -(OH) $_2$ D (Bischoff i wsp., 2001; Hewison i wsp., 2007). Jak wspomniano wcześniej, produkowany przez różne tkanki organizmu kalcytriol działa głównie auto- i parakrynnie, co nie znajduje odzwierciedlenia na poziomie jego stężenia we krwi (Alonso i wsp., 2022). Aktywność biologiczna  $1,25$ -(OH) $_2$ D zależy od wiązania z receptorem witaminy D (VDR, ang. *vitamin D receptor*) (Pike i Christakos, 2017). Połączenie kalcytriolu z receptorem VDR wpływa na określone sekwencje DNA, zlokalizowane w różnych regionach genomu (Alonso i wsp., 2022). Wysoce konserwatywna domena tego receptora zawiera tzw. palce cynkowe i wiąże się z DNA. Charakterystyczna sekwencja w regionie promotora genu docelowego VDRE (VDER, ang. *vitamin D responsive element*) jest rozpoznawana dzięki obecności trzech aminokwasów wchodzących w skład jednego z palców cynkowych. W pobliżu domeny wiążącej ligand występuje domena dimeryzacyjna, która wiąże się z receptorem kwasu retynowego (RXR, ang. *retinoid x receptor*) tworząc heterodimer. Kalcytriol aktywując VDR, po połączeniu w heterodimery

z receptorem retinoidowym RXR, wpływa na ekspresję genów i zapoczątkowuje proces transkrypcji (Haussler i wsp., 1995).

Okres półtrwania 1,25-(OH)<sub>2</sub>D wynosi tylko 4-6 godzin, co sprawia że stężenie kalcytriolu w surowicy jest zmienne. Oba metabolity (kalcydiol, kalcytriol) mają podobne właściwości fizyczne i chemiczne. Jednak w przeciwieństwie do kalcydiolu, kalcytriol nie odzwierciedla stężenia witaminy D w organizmie (Alonso i wsp., 2022). Suplementacja witaminy D zwiększa stężenie 25-(OH)D w surowicy, ale nie ma wpływu na stężenie 1,25-(OH)<sub>2</sub>D (Barger-Lux i wsp., 1998; Alonso i wsp., 2022). Niektóre badania sugerują, że nie ma związku pomiędzy tymi dwoma metabolitami (Tang i wsp., 2019, Ginsberg i wsp., 2020), choć wydaje się, że 1,25-(OH)<sub>2</sub>D jest produkowany w zależności od potrzeb komórkowych, podczas gdy 25-(OH)D odzwierciedla zapasy witaminy D w organizmie dostępne do wykorzystania.

Wyniki badań dotyczące ekspresji genów, jak i badania eksperymentalne przeprowadzone *in vitro* i *in vivo* sugerują, że witamina D może mieć wielokierunkowe ogólnoustrojowe działanie. W dostępnym piśmiennictwie znajdują się prace wskazujące na związek witaminy D z funkcjonowaniem układów: kostnego, mięśniowego, immunologicznego i sercowo-naczyniowego u sportowców (Herrmann i wsp., 2017; Owens i wsp., 2018; Caballero-García i wsp., 2021). Z tego względu kalcytriol może mieć związek ze zdolnościami wysiłkowymi oraz regeneracją powysiłkową, a co za tym idzie wpływać na wyniki sportowe zawodników.

Synteza kalcytriolu jest kontrolowana w nerkach na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego z PTH. Na skutek działania 1,25-(OH)<sub>2</sub>D dochodzi do zwiększenia reabsorpcji fosforanów prowadzących do uwolnienia czynnika wzrostu FGF-23. Zwiększające się stężenie FGF-23 hamuje aktywność 1 $\alpha$ -hydroksylazy i aktywuje 24-hydroksylazę, co prowadzi do syntezy 24,25-dihydroksy-witaminy D (24,25-(OH)<sub>2</sub>D). Uważa się, że 24,25-(OH)<sub>2</sub>D jest nieaktywnym metabolitem witaminy D, jednak niektóre doniesienia naukowe wskazują, że może on pełnić ważną funkcję w dojrzewianiu i wzroście chrząstki stawowej (Seo i wsp., 1997; Nemere i wsp., 2006).

### Znaczenie biologiczne 24,25-(OH)<sub>2</sub>D

Metabolit 24,25-(OH)<sub>2</sub>D powstaje w pierwszym etapie inaktywacji i usunięcia witaminy D z obiegu, gdy dostępne są wystarczające ilości kalcydiolu.

Zjawiska te zachodzą głównie poprzez CYP24A1, który metabolizuje 25-(OH)D do 24,25-(OH)<sub>2</sub>D i 1,25(OH)<sub>2</sub>D do 1,24,25-trihydroksywitaminy D (1,24,25(OH)<sub>3</sub>D) (Makris i wsp., 2020b). U zdrowych osób stężenie 24,25-(OH)<sub>2</sub>D w surowicy wynosi około 10% całkowitego stężenia 25-(OH)D. Oba metabolity są ze sobą wysoce skorelowane (Tang i wsp., 2019; Cashman i wsp., 2015). Jednoczesne oznaczanie 25-(OH)D i 24,25-(OH)<sub>2</sub>D może być przydatne do identyfikacji pacjentów z obniżoną aktywnością CYP24A1. Osoby, u których występuje obniżona aktywność CYP24A1, charakteryzują się zmniejszonym stosunkiem 24,25-(OH)<sub>2</sub>D do 25-(OH)D (Makris i wsp., 2020b; Alonso i wsp., 2022). Stosunek ten jest również znany jako stosunek metabolitów witaminy D (VMR, ang. *vitamin D metabolite ratio*). U osób, u których występują objawy hiperkalcemii pomiar metabolitów witaminy D oraz obliczenie VMR pozwala na odróżnienie niedoboru CYP24A1 od innych przyczyn hiperkalcemii, takich jak zatrucie witaminą D czy inne schorzenia (Alonso i wsp., 2022). Cavalier i wsp. (2020) zaproponowali jednoczesną ocenę 24,25-(OH)<sub>2</sub>D i 25-(OH)D jako pomiar metabolizmu witaminy D, który pomaga w identyfikacji osób z niedoborem witaminy D. Na podstawie badań prowadzonych w grupie 1200 osób (niemowlęta, dzieci, nastolatki, młodzi, młode osoby dorosłe <20 roku życia) wykazano, że różne osoby z tym samym stężeniem 25-(OH)D mogą mieć różne stężenie 24,25-(OH)<sub>2</sub>D, co może sugerować, że zasoby kalcydiolu nie świadczą o odpowiednim zaopatrzeniu organizmu w witaminę D. Ta obserwacja sugeruje potrzebę ustalenia indywidualnego statusu witaminy D ocenianego na podstawie jednoczesnej analizy 24,25-(OH)<sub>2</sub>D i 25-(OH)D. Ocena stosunków metabolitów witaminy D może być również zasadna u Afroamerykanów, gdzie równoległe oznaczanie obu metabolitów lepiej odzwierciedla stan zaopatrzenia organizmu w witaminę D w porównaniu do pomiaru samego stężenia 25-(OH)D. Warto również dodać, że Afroamerykanie mają średnio o 40% niższe stężenie 25-(OH)D w surowicy, co wynika z różnic etnicznych w częstości występowania polimorfizmów w genie VDBP (Makris i wsp., 2021).

Aktualne wytyczne nie zalecają pomiaru 24,25-(OH)<sub>2</sub>D w praktyce klinicznej. Dowody naukowe sugerują jednak, że rutynowe oznaczenie stężenia 24,25-(OH)<sub>2</sub>D

i obliczenie wskaźnika VMR może być pomocne w indywidualizacji oceny stanu zaopatrzenia organizmu w witaminę D u osób zdrowych.

### **Znaczenie biologiczne 3-epi- 25-(OH)D**

Zróznicowanie przestrzenne metabolitów witaminy D w krwioobiegu jest związane dodatkowo z naturalnym procesem, jakim jest epimeryzacja. Epimeryzacja kalcydiolu, kalcytriolu oraz innych metabolitów witaminy D polega na enzymatycznej konwersji wokół asymetrycznego atomu węgla C-3. Uważa się, że ta nieodwracalna modyfikacja jest katalizowana przez enzym 3-epimerazę (szlak epimeryzacji C-3), zlokalizowany w retikulum endoplazmatycznym wątroby, kości i skóry. W wyniku epimeryzacji syntetyzowane epimery C-3b-hydroksy witaminy D ulegają przekształceniu do odpowiednich C-3 $\alpha$ -hydroksy epimerów (epimery-C3). Epimeryzacja nie zmienia ciężaru cząsteczkowego oraz sekwencji występujących w związku atomów, ale zmienia ich konfigurację przestrzenną, wpływając na aktywność chemiczną i biologiczną epimerów (Kamao i wsp., 2001).

W dostępnym piśmiennictwie są dane, które wskazują, że 3-epi-25-(OH)D ma niskie powinowactwo do VDBP, co częściowo wyjaśnia niskie jego stężenie w surowicy. U osób dorosłych stężenie 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> nie ma związku z wiekiem (Strathmann i wsp., 2012), a wyższe stężenie epimeru jest najczęściej obserwowane przy zwiększonym stężeniu 25-(OH)D<sub>3</sub> (Lensmeyer i wsp., 2012). Obecnie uważa się, że 3-epi-25-(OH)D nie odzwierciedla odpowiednio statusu witaminy D, dlatego nie zaleca się oznaczania tego metabolitu. Jednakże, wyniki badań wskazują, że stężenie 3-epi-25-(OH)D jest bezpośrednio związane z ryzykiem chorób układu sercowo-naczyniowego, a 3-epi-1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D (pochodna 3-epi-25-(OH)D) obniża stężenie PTH we krwi, bez wpływu na stężenie wapnia (Brown i wsp., 2005; Lutsey i wsp., 2015). Należy także podkreślić, że rola 3-epimerów witaminy D u osób zdrowych wciąż nie została poznana, a aktualny stan wiedzy na ten temat pochodzi głównie z badań *in vitro*.

### **Stężenie witaminy D u osób realizujących wzmożony wysiłek fizyczny**

Niedobór lub niedostateczne stężenie witaminy D jest powszechnym problemem wielu populacji na całym świecie, w tym również sportowców. W meta-analizie piśmiennictwa z lat 2008-2014, wykazano, że u 56% badanych zawodników stężenie 25-(OH)D było <32 ng/ml (Farrokhyar i wsp., 2015). Niedobór witaminy D występuje szczególnie często wśród sportowców zamieszkujących tereny na szerokościach geograficznych >45°, szczególnie późną jesienią i zimą, a także

u zawodników uprawiających sporty halowe. Harju i wsp. (2022) dokonali przeglądu 51 badań, biorąc pod uwagę głównie różnice w stężeniu witaminy D w zależności od płci (kobiety vs. mężczyźni) oraz wieku badanych zawodników (nastolatki vs. osoby dorosłe). Otrzymane wyniki sugerują, że co najmniej jedna trzecia dorosłych zawodników i młodych sportowców wykazuje niedobory witaminy D, szczególnie w okresie zimy oraz wiosny (Harju i wsp., 2022).

Powszechnie stosowanym wskaźnikiem do oceny stanu zaopatrzenia w witaminę D jest pomiar stężenia 25-(OH)D w surowicy krwi (Makris i wsp., 2020a; Alonso i wsp., 2022). Norma stężenia 25-(OH)D w surowicy wciąż pozostaje przedmiotem dyskusji. W ostatnich latach zdefiniowano ciężki deficyt jako stężenie <10 ng/mL (25 nmol/L), natomiast wartości <20 ng/mL (50 nmol/L) jako niedobór witaminy D (Płudowski i wsp., 2023).

Na krążącą w krwioobiegu witaminę D składają się trzy główne frakcje: wolna, biodostępna i całkowita 25-(OH)D. Z ogólnej ilości krążącej witaminy D, około 85-90% jest związane z VDBP, około 10-15% z albuminą, a niewielkie ilości (mniej niż 0,03%) krążą w wolnej, niezwiązanej formie. Suma frakcji wolnej 25-(OH)D i związanej z albuminą tworzy frakcję biodostępną. Z kolei suma wolnej, związanej z albuminą i VDBP jest określana jako frakcja całkowita 25-(OH)D (Bikle i wsp., 2017).

Dotychczas kalcydiol w postaci całkowitej był uważany za najlepszy marker stężenia witaminy D w organizmie (Makris i wsp., 2020a; Alonso i wsp., 2022). Pomiar całkowitej 25-(OH)D jest wykonywany z dwóch głównych powodów: w celu określenia stanu zaopatrzenia organizmu witaminą D oraz monitorowania efektywności suplementacyjnej cholekalcyferolu. Powszechność stosowania całkowitej 25-(OH)D jako markera stanu zaopatrzenia organizmu witaminą D wynika z kilku powodów:

- stężenie kalcydiolu we krwi jest wyższe niż jakiegokolwiek innego metabolitu witaminy D (stężenie całkowitej 25-(OH)D – 10-80 ng/mL, czyli 1000 razy wyższe niż stężenie 1,25-(OH)<sub>2</sub>D – 20-60 pg/mL),
- kalcydiol ma stosunkowo długi okres półtrwania (2-3 tygodnie) w porównaniu do 1,25-(OH)<sub>2</sub>D (około 4-6 godzin), a zatem stężenie całkowitej 25-(OH)D w surowicy różni się nieznacznie w krótkich odstępach czasu,



- całkowita 25-(OH)D stanowi sumę pochodzącą ze spożycia witaminy D i syntezy skórnej (Makris i wsp., 2020a, Makris i wsp., 2021; Alonso i wsp., 2022).

Niektórzy autorzy wskazują także na liczne wady wynikające z dokonywania pomiaru frakcji całkowitej 25-(OH)D (Lay i wsp., 2010; Fraser i wsp., 2020). Biodostępność 25-(OH)D może się różnić u poszczególnych osób w zależności od polimorfizmów genów syntezy białek nośnikowych (Powe i wsp., 2013).

Białko wiążące witaminę D jest wysoce polimorficznym białkiem z ponad 100 izoformami, które jest kodowane przez gen VDBP na chromosomie 4q12-q13. Strukturalnie jest blisko spokrewnione z albuminą i alfa-fetoproteiną (Bikle i Schwartz, 2019). Białko wiążące witaminę D jest głównie produkowane w wątrobie, ale badania na modelach zwierzęcych sugerują, że może być syntetyzowane także w innych tkankach, takich jak nerki, jądra i tkanka tłuszczowa (Cooke i wsp., 1991). Polimorficzny charakter genu VDBP powoduje liczne warianty tego białka (np. Gc1f, Gc1s i Gc2), co z kolei prowadzi do występowania różnic w powinowactwie do 25-(OH)D. Ponadto, różne allele Gc mogą wpływać na odpowiedź na suplementację witaminą D (Fu i wsp., 2009; Alonso i wsp., 2022).

### **Nowe wskaźniki oceny aktywności biologicznej witaminy D**

Stężenie białek nośnikowych (VDBP) w surowicy moduluje stężenie całkowitej 25-(OH)D. Z tego względu, w oparciu o hipotezę wolnego hormonu (Chun i wsp., 2014; Bikle 2021), zaproponowano, że wolna 25-(OH)D może być lepszym markerem oceny oddziaływania biologicznego na tkanki niż całkowita 25-(OH)D. Podobnie jak w przypadku innych hormonów steroidowych, uważa się, że tylko niezwiązana frakcja (wolna frakcja) hormonów jest w stanie wnikać do komórki, aby związać receptor witaminy D i wpływać na metabolizm komórkowy. Hipoteza wolnego hormonu jest wspierana także przez różne obserwacje, choć istnieją liczne poglądy negujące znaczenie oznaczania wolnej frakcji witaminy D (Chun i wsp., 2014; Bikle i Schwartz, 2019).

Wolna 25-(OH)D może być mierzona bezpośrednio lub kalkulowana (Bikle i wsp., 1986; Vermeulen i wsp., 1999) na podstawie stężenia całkowitej 25-(OH)D, VDBP i albuminy w surowicy. Zasadniczo obie metody powinny dawać podobne wyniki, ale nie zawsze tak jest.

W badaniach klinicznych wykazano, że wolna 25-(OH)D jest silnie związana z całkowitą 25-(OH)D u większości osób i odwrotnie z PTH. W stanach

chorobowych, na przykład takich jak marskość wątroby, stężenie VDBP i albuminy są prawdopodobnie obniżone. Z tego względu w niektórych sytuacjach status witaminy D oparty na pomiarach wolnych metabolitów, może różnić się od tych opartych na pomiarach całkowitych stężeń metabolitów witaminy D. Z uwagi na powyższe u niektórych osób stężenie wolnej 25-(OH)D może stanowić lepszy wskaźnik stanu zaopatrzenia organizmu w witaminę D niż całkowita 25-(OH)D (Bikle i wsp., 2017; Bikle i Schwartz, 2019).

Kolejnym wartym uwagi markerem oceny statusu witaminy D, jak już wcześniej wspomniano, jest oznaczenie 24,25-(OH)<sub>2</sub>D i obliczenie stosunku 24,25-(OH)<sub>2</sub>D:25-(OH)D.

W dostępnym piśmiennictwie znajdują się informacje, które wskazują, że VMR, a w szczególności stosunek 24,25-(OH)<sub>2</sub>D do 25-(OH)D (tj. stosunek wskazujący, ile prekursora przekształci się w formę bioaktywną) może lepiej reprezentować status witaminy D niż całkowita 25-(OH)D. Ustalono, że stosunek 24,25-(OH)<sub>2</sub>D:25-(OH)D powinien wynosić od 4% do 12%, co może odzwierciedlić prawidłowe stężenie witaminy D niezależnie od stężenia całkowitej 25-(OH)D (Alonso i wsp., 2022).

Niektóre badania (Cashman i wsp., 2015; Ginsberg i wsp., 2020) sugerują, że ocena stosunku 24,25-(OH)<sub>2</sub>D do 25-(OH)D może być lepszym wskaźnikiem niedoboru witaminy D u zdrowych osób o różnym poziomie aktywności fizycznej (Alonso i wsp., 2022), ponieważ różnice etniczne nie mają wpływu na wartość VMR (Berg i wsp., 2015). Ostatnie dowody wskazują, że VMR jest silniej związany z gęstością mineralną kości (Ginsberg i wsp., 2018) i stężeniem PTH (Bosworth i wsp., 2012) niż całkowita 25-(OH)D. Z tego względu przypuszcza się, że VMR może dostarczyć dodatkowych funkcjonalnych informacji na temat metabolizmu witaminy D, także u sportowców.

Niektóre doniesienia naukowe wskazują na przydatność pomiaru stężenia wolnej frakcji 25-(OH)D oraz VMR w ocenie biologicznego statusu witaminy D. Niemniej jednak potrzebne są dalsze badania dotyczące oceny wolnej witaminy D i 24,25-(OH)<sub>2</sub>D, co może poszerzyć wiedzę na temat metabolizmu witaminy D u osób o różnym poziomie aktywności fizycznej.

#### 4.4. Cele wskazane w cyklu publikacji

W monotematycznym cyklu czterech prac naukowych sformułowano następujące cele badawcze:

- a. Krytyczna analiza aktualnego stanu wiedzy na temat związku pomiędzy stężeniem całkowitej 25-(OH)D a funkcją mięśni szkieletowych i elementami sprawności motorycznej zawodników oraz wpływem suplementacji witaminą D na zdolności wysiłkowe sportowców, która umożliwi precyzyjne i celowe sformułowanie istotnych zagadnień badawczych (Publikacja 1).
- b. Sprawdzenie, czy trening sportowy, realizowany na otwartej przestrzeni i w pomieszczeniach zamkniętych, modyfikuje spoczynkowe stężenie metabolitów witaminy D (Publikacja 2).
- c. Ocena związku pomiędzy stężeniem metabolitów witaminy D a możliwościami wysiłkowymi zawodników wybranych dyscyplin sportowych (Publikacja 2).
- d. Ocena wpływu wieloletniego, regularnego treningu sportowego na metabolizm witaminy D u zawodników trenujących judo i piłkę nożną (Publikacja 3).
- e. Zbadanie, czy wolna 25-(OH)D wykazuje silniejszy związek z metabolitami witaminy D niż całkowita 25-(OH)D u mężczyzn o niskim poziomie aktywności fizycznej oraz sportowców (Publikacja 3).
- f. Ocena związku pomiędzy obciążeniami wysiłkowymi w różnych okresach treningowych a stężeniem metabolitów witaminy D u zawodników trenujących piłkę nożną (Publikacja 4).

#### 4.5. Omówienie realizacji celów w poszczególnych pracach

Badania, których wyniki zostały zaprezentowane w cyklu prac naukowych były realizowane w ramach grantu wewnętrznego Akademii Wychowania Fizycznego im. Polskich Olimpijczyków we Wrocławiu pt. „*Witamina D – wolna i całkowita a zdolności wysiłkowe u sportowców (Z.19.03)*”, którego byłam wykonawcą.

W ostatnich latach nastąpił wzrost zainteresowania badaniami dotyczącymi stanu zaopatrzenia organizmu w witaminę D u sportowców. Coraz więcej doniesień naukowych świadczy o wielokierunkowym działaniu witaminy D oraz o powszechnie występujących jej niedoborach (Farrokhyar i wsp., 2015; Owens i wsp., 2018; Harju i wsp., 2022).

Witamina D aktywuje wiele procesów metabolicznych w tkance mięśniowej, oddziałując za pośrednictwem dwóch typów receptorów, co może skutkować pobudzeniem syntezy białek, zwiększaniem liczby komórek mięśniowych typu II, a tym samym wzrostem szybkości i siły mięśni. Wynikiem współdziałania aktywowanych białek jest skurcz mięśnia. Ponadto kalcytriol pełni dodatkową rolę w proliferacji komórek mięśniowych, ich różnicowaniu i hamowaniu apoptozy (Owens i wsp., 2018; Dzik i Kaczor, 2019). Z tego względu działanie witaminy D może mieć wielokierunkowy związek ze zdolnościami wysiłkowymi sportowców.

Celem pracy pod tytułem *Vitamin D, Skeletal Muscle Function and Athletic Performance in Athletes – A Narrative Review (Książek i wsp., 2019 Nutrients)* było dokonanie krytycznej analizy aktualnego stanu wiedzy na temat związku pomiędzy stężeniem całkowitej 25-(OH)D a funkcją mięśni szkieletowych i elementami sprawności motorycznej zawodników oraz wpływem suplementacji witaminą D na zdolności wysiłkowe sportowców, która umożliwi precyzyjne i celowe sformułowanie istotnych zagadnień badawczych.

Analizie poddano 8 prac dotyczących związku pomiędzy stężeniem całkowitej 25-(OH)D a zdolnościami wysiłkowymi i maksymalnym poborem tlenu ( $VO_{2max}$ ) u sportowców. W 4 analizowanych publikacjach wskazano na istotny związek pomiędzy stężeniem całkowitej 25-(OH)D a  $VO_{2max}$  (Forney i wsp., 2014), wysokością skoku pionowego, czasem sprintu (10 i 20 m),  $VO_{2max}$  (Koundourakis i wsp., 2014), szczytowym momentem sił mięśniowych kończyn dolnych (Książek i wsp., 2016) i siłą ścisku lewej dłoni oraz mocą kończyn dolnych (Książek i wsp., 2018) u zawodników różnych dyscyplin sportowych. Na podstawie zebranych danych stwierdzono, że związek pomiędzy witaminą D a zdolnościami

wysiłkowymi może występować głównie u sportowców z obniżonym stężeniem całkowitej 25-(OH)D (<30 ng/ml). Z tego względu stężenie całkowitej 25-(OH)D powinno być regularnie monitorowane i utrzymywane na poziomie >30 ng/ml, co może korzystnie wpływać na funkcje mięśni szkieletowych oraz zdolności wysiłkowe sportowców.

Do przeglądu piśmiennictwa włączono także 14 prac dotyczących wpływu suplementacji cholekalcyferolem na zdolności wysiłkowe i  $VO_{2max}$  sportowców. Tylko w 4 analizowanych pracach udokumentowano pozytywny wpływ suplementacji witaminą D na wysokość skoku pionowego, czas sprintu na 10 m (Close i wsp., 2013), wysokość skoku pionowego, siłę izometryczną kończyn dolnych (Wyon i wsp., 2016) oraz  $VO_{2max}$  (Jastrzębski 2016; Jastrzębska i wsp., 2018). Mechanizm odpowiadający za zróżnicowany wpływ suplementacji witaminą D na siłę mięśni kończyn dolnych i górnych nie został do końca poznany. Przypuszcza się, że różnice w występowaniu receptora witaminy D w różnych grupach mięśni mogą przyczyniać się do odmiennych efektów suplementacyjnych cholekalcyferolem.

W podsumowaniu pracy wskazano, że konieczne są dalsze badania w celu oceny stanu zaopatrzenia organizmu w witaminę D poprzez pomiar wolnej zamiast całkowitej 25-(OH)D. Ponadto istotną kwestią wydaje się prowadzenie badań nad związkiem pomiędzy stężeniem wolnej witaminy D a funkcją mięśni szkieletowych i elementami sprawności motorycznej sportowców.

Celem kolejnej pracy pod tytułem *Relationship Between Metabolites of Vitamin D, Free 25-(OH)D, and Physical Performance in Indoor and Outdoor Athletes* (Książek i wsp., 2022 *Front Physiol*) była ocena stężenia VDBP, metabolitów witaminy D, wolnej oraz biodostępnej 25-(OH)D w surowicy krwi u sportowców trenujących w pomieszczeniach zamkniętych i przestrzeniach otwartych. Ponadto dokonano oceny związku pomiędzy stężeniem VDBP, metabolitów witaminy D (24,25-(OH)<sub>2</sub>D i 3-epi-25-(OH)D, 1,25-(OH)<sub>2</sub>D), wolnej oraz biodostępnej 25-(OH)D a zdolnościami wysiłkowymi u zawodników wybranych dyscyplin sportu.

W dostępnym piśmiennictwie pojawiają się dane podważające zasadność pomiaru stężenia całkowitej 25-(OH)D w celu oceny stanu zaopatrzenia organizmu w witaminę D (Bikle i wsp., 2017). Zgodnie z teorią wolnych hormonów (Chun i wsp., 2014; Bikle 2021) tylko niezwiązana z białkiem frakcja witaminy D jest

w stanie wnikać do wnętrza komórek, a następnie wpływać na ich czynność i metabolizm (Bikle i Schwartz, 2019). Niektórzy autorzy udokumentowali, że wolna 25-(OH)D wykazuje silniejszy związek z gęstością mineralną kości (Powe i wsp., 2011) oraz stężeniem PTH (Shieh i wsp., 2016) niż całkowita 25-(OH)D u zdrowych, dorosłych osób.

Tylko kalcytriol uważany jest za aktywną biologicznie formę witaminy D, w przeciwieństwie do pozostałych metabolitów. Niemniej jednak coraz większe zainteresowanie budzą metabolity witaminy D, między innymi takie jak 24,25-(OH)<sub>2</sub>D i 3-epi-25-(OH)D. W dostępnym piśmiennictwie brak jest danych dotyczących stężenia metabolitów witaminy D i ich związku z elementami sprawności motorycznej u sportowców.

W badaniach wzięło udział 40 mężczyzn, w tym 16 zawodników trenujących judo (trenujących w pomieszczeniach zamkniętych) oraz 24 zawodników trenujących piłkę nożną (trenujących na otwartej przestrzeni). Kryterium wyłączenia z badań było stosowanie suplementów diety zawierających witaminę D oraz wapń. Badania przeprowadzono na przełomie lutego i marca 2021 r. we Wrocławiu, położonym na szerokości geograficznej 51°06' N.

Do oceny stężenia wolnej i biodostępnej 25-(OH)D zastosowano metodę kalkulacyjną wykorzystującą stężenie albuminy, VDBP oraz całkowitej 25-(OH)D (Bikle i wsp., 1986; Vermeulen i wsp., 1999; Powe i wsp., 2013). Oznaczenie stężenia metabolitów witaminy D (25-(OH)D<sub>2</sub>, 25-(OH)D<sub>3</sub>, 24,25-(OH)<sub>2</sub>D i 3-epi-25-(OH)D, 1,25-(OH)<sub>2</sub>D) dokonano za pomocą metody uznanej za złoty standard, czyli tandemowej spektrometrii mas sprzężonych z wysokosprawną chromatografią cieczą (LC-MS/MS). Pomiarów siły ścisku dłoni [kg] dokonano za pomocą dynamometru ręcznego. Wysokość skoku [cm], siłę szczytową [N], moc szczytową [W], prędkość szczytową [m/s], zmodyfikowany indeks siły reaktywnej (RSI<sub>mod</sub>) [m/s], stosunek szczytowej siły eksplozywnej do masy ciała [N/kg], stosunek szczytowej mocy eksplozywnej do masy ciała [W/kg], stosunek średniej siły eksplozywnej [N/kg] oraz mocy eksplozywnej do masy ciała [W/kg] kończyn dolnych sprawdzono za pomocą testu skoku pionowego bez zamachu przy użyciu platformy elektronicznej (Owen i wsp., 2014). W celu wyznaczenia VO<sub>2max</sub> [ml/kg/min] zastosowano przerywany test biegowy 30-15 (Buchheit 2008).

Wyniki badań wskazały na brak statystycznie istotnej różnicy w stężeniu VDBP, metabolitów witaminy D (25-(OH)D<sub>3</sub>, 25-(OH)D<sub>2</sub>, 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>,

3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>, 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) oraz wolnej, biodostępnej i całkowitej 25-(OH)D pomiędzy grupami badanych zawodników trenujących w przestrzeniach zamkniętych i otwartych.

Stwierdzono statystycznie istotną dodatnią korelację pomiędzy stężeniem 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> i 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> a wysokością skoku pionowego, prędkością szczytową, mocą szczytową, wskaźnikiem RSI<sub>mod</sub>, średnią siłą eksplozywną oraz szczytową i średnią mocą eksplozywną kończyn dolnych u zawodników trenujących judo. Wskazano również na statystycznie istotny związek pomiędzy stężeniem 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> i siłą ścisku lewej oraz prawej dłoni u sportowców trenujących w przestrzeniach zamkniętych. Analiza wykazała, że 1,25-(OH)<sub>2</sub>D jest istotnie związany z siłą ścisku prawej dłoni oraz szczytową i średnią mocą eksplozywną kończyn dolnych u zawodników trenujących judo.

W grupie zawodników trenujących na otwartej przestrzeni analiza wykazała, że szczytowe siła i moc oraz średnie siła i moc eksplozywna były istotnie związane ze stężeniem 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>.

Analizowano związek pomiędzy stężeniem wolnej, biodostępnej i całkowitej 25-(OH)D a zdolnościami wysiłkowymi u zawodników trenujących w przestrzeniach zamkniętych. Stwierdzono statystycznie istotną korelację pomiędzy stężeniem wolnej 25-(OH)D a siłą ścisku lewej dłoni w tej grupie zawodników. Analiza statystyczna wykazała, że wolna, biodostępna i całkowita 25-(OH)D korelują dodatnio z wysokością skoku pionowego, prędkością szczytową, mocą szczytową, siłą szczytową, RSI<sub>mod</sub> oraz średnią siłą i mocą eksplozywną kończyn dolnych u zawodników trenujących judo.

Nie stwierdzono natomiast istotnej korelacji pomiędzy VDBP, wolną, biodostępna i całkowita 25-(OH)D a badanymi parametrami zdolności wysiłkowych u zawodników trenujących na otwartej przestrzeni.

Podsumowując, elementem nowatorskim naszych badań było wykazanie związku pomiędzy metabolitami witaminy D (24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>), wolną i biodostępna 25-(OH)D a zdolnościami wysiłkowymi sportowców. Obserwacje te sugerują, że metabolity witaminy D mogą odgrywać istotną rolę w funkcjonowaniu mięśni szkieletowych, a co za tym idzie wpływać na siłę i moc mięśni kończyn dolnych.

W kolejnej pracy pod tytułem *Metabolism of vitamin D is not affected by sport activity (Książek i wsp., 2023 Clin Chim Acta)* oceniono, czy wieloletni, regularny

trening sportowy wpływa na metabolizm witaminy D. Z tego względu dokonano oceny stężenia VDBP, wolnej, biodostępnej 25-(OH)D, metabolitów witaminy D (24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>, 1,25-(OH)<sub>2</sub>D) i wartości stosunków metabolitów witaminy D (25-(OH)D<sub>3</sub>:24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>; 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>:25-(OH)D<sub>3</sub>; 25-(OH)D<sub>3</sub>:3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>; 1,25-(OH)<sub>2</sub>D:24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) u mężczyzn o niskim poziomie aktywności fizycznej i sportowców. Ponadto oceniono związek pomiędzy stężeniem VDBP, wolnej i całkowitej 25-(OH)D, a metabolitami witaminy D oraz stosunkami metabolitów witaminy D w badanych grupach.

Ostatnie badania wykazały, że wyższy poziom aktywności fizycznej jest związany z wyższym stężeniem 25-(OH)D (Sun i wsp., 2017). Badania dotyczące wpływu pojedynczego wysiłku na stężenie metabolitów witaminy D zostały dobrze udokumentowane (Sun i wsp., 2017; Mieszkowski i wsp., 2020; Dzik i wsp., 2022). Brak jest jednak danych na temat wpływu regularnego, wieloletniego treningu sportowego na metabolizm witaminy D.

Grupę badaną stanowiło 69 uczestników: 27 mężczyzn o niskim poziomie aktywności fizycznej i 42 sportowców (w tym 18 zawodników trenujących judo i 24 zawodników trenujących piłkę nożną). Mężczyźni o niskim poziomie aktywności fizycznej byli rekrutowani za pomocą plakatów umieszczanych w mediach społecznościowych oraz miejscach publicznych. Kryteriami włączenia do badań był wiek w przedziale 18 – 30 lat, BMI w zakresie 18 – 30 kg/m<sup>2</sup>, rasa biała, brak zdiagnozowanych chorób przewlekłych i aktywność fizyczna trwająca poniżej 150 minut/tydzień. Wymogami uwzględnienia w badaniach dla grupy sportowców były: staż treningowy  $\geq 7$  lat, objętość treningowa na poziomie  $>10$  h/tydzień i uczestnictwo w rywalizacji sportowej, co najmniej na poziomie krajowym.

Oznaczenie wolnej 25-(OH)D oraz metabolitów witaminy D zostało wykonane za pomocą metod badawczych w poprzednio opisanej publikacji (**Publikacja 2**).

Wykazano, że VDBP, wolna, biodostępna, całkowita 25-(OH)D, 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>, 1,25-(OH)<sub>2</sub>D, VMR (25-(OH)D<sub>3</sub>:24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>; 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>: 25-(OH)D<sub>3</sub>; 25-(OH)D<sub>3</sub>:3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>; 1,25-(OH)<sub>2</sub>D:24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) nie różniły się pomiędzy grupami (mężczyźni o niskim poziomie aktywności fizycznej vs. judocy vs. piłkarze nożni). Nie było również różnic w badanych zmiennych pomiędzy mężczyznami o niskim poziomie



aktywności fizycznej i grupą sportowców, gdy połączono zawodników trenujących judo z zawodnikami trenującymi piłkę nożną.

Analiza wyników badań wykazała silny związek pomiędzy stężeniem 24,25-(OH)D<sub>3</sub> i 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> a całkowitą i wolną 25-(OH)D w każdej z badanych grup (mężczyźni o niskim poziomie aktywności fizycznej vs. judocy vs. piłkarze nożni). Po połączeniu wszystkich wyników również stwierdzono silny związek pomiędzy wyżej wskazanymi zmiennymi.

Pomimo bezpośredniej konwersji enzymatycznej 25-(OH)D do 1,25-(OH)<sub>2</sub>D nie zaobserwowano związku tych dwóch metabolitów w żadnej z badanych grup. W grupie zawodników trenujących piłkę nożną wykazano ujemną korelację pomiędzy stężeniem 1,25-(OH)<sub>2</sub>D a wolną 25-(OH)D w surowicy.

Podsumowując, na podstawie uzyskanych wyników badań wykazano, że regularny, wieloletni trening sportowy nie ma wpływu na spoczynkowe stężenie metabolitów witaminy D. Stwierdzono także, że wolna witamina D nie wykazuje silniejszego związku z metabolitami witaminy D oraz stosunkami metabolitów witaminy D w porównaniu do całkowitej 25-(OH)D.

Celem pracy pod tytułem *Seasonal changes in free 25-(OH)D and vitamin D metabolite ratios and their relationship with psychophysical stress markers in male professional football players (Książek i wsp., 2023 Front Physiol)* była ocena stężenia wolnej, biodostępnej 25-(OH)D, metabolitów witaminy D, stosunków metabolitów witaminy D i wskaźników stanu przemęczenia (ferrytyna, enzymy wątrobowe – ALT, AST, kinaza kreatynowa, hs-CRP, testosteron i kortyzol) w surowicy krwi zawodników trenujących piłkę nożną na wysokim poziomie sportowym w różnych okresach treningowych. Następnie sprawdzono związek pomiędzy stężeniem VDBP, wolnej i całkowitej 25-(OH)D, metabolitami witaminy D, stosunkami metabolitów witaminy D a wskaźnikami stanu przemęczenia w badanej grupie. Sprawdzono związek pomiędzy obciążeniami wysiłkowymi w różnych okresach treningowych a stężeniem metabolitów witaminy D. Z tego względu oceniono związek pomiędzy stężeniem 25-(OH)D<sub>3</sub> a 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> i 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> w badanej grupie zawodników.

Głównym źródłem witaminy D jest synteza skórna podczas ekspozycji na światło słoneczne. Skutkuje to sezonową zmiennością jej stężenia i jest uzależnione od kilku czynników środowiskowych, takich jak szerokość geograficzna, wysokość nad poziomem morza, pora roku i panujące warunki

pogodowe (Makris i wsp., 2020a). W dostępnym piśmiennictwie znajdują się badania dotyczące sezonowych zmian stężenia całkowitej 25-(OH)D u sportowców (Lombardi i wsp., 2017; Vitale i wsp., 2018). Nie ma jednak badań dotyczących sezonowych zmian wolnej 25-(OH)D, metabolitów witaminy D oraz stosunków metabolitów witaminy D, szczególnie uwzględniających różne okresy treningowe.

Receptor witaminy D ulega ekspresji w mięśniach szkieletowych i odgrywa ważną rolę zarówno w regeneracji, jak i utrzymaniu funkcji mitochondriów (Latham i wsp., 2021). Najnowsze dane naukowe sugerują, że witamina D może przyczyniać się do regeneracji mięśni szkieletowych (Latham i wsp., 2021; Puangthong i wsp., 2021).

Grupę badaną stanowiło 20 zawodników trenujących piłkę nożną (średnia wieku  $27,0 \pm 5,0$  lat), zrekrutowanych z klubu rywalizującego w najwyższej polskiej klasie męskich rozgrywek ligowych – "Ekstraklasa". Krew do oznaczeń metabolitów witaminy D oraz wskaźników stanu przemęczenia pobierano w trakcie Rundy Jesiennej w ramach rozgrywek „PKO BP Ekstraklasy” od czerwca 2021 do stycznia 2022 r. Próby pobierano w sześciu okresach:

- w czerwcu – przed okresem przygotowawczym,
- w lipcu – po okresie przygotowawczym,
- w sierpniu – w trakcie okresu startowego,
- w październiku – w trakcie okresu startowego,
- w grudniu – po zakończeniu okresu startowego,
- w styczniu – po zakończeniu okresu przejściowego.

Zawodnicy regularnie trenowali i rozgrywali mecze na szerokości geograficznej pomiędzy  $50^\circ$  a  $54^\circ\text{N}$ . Sportowcy z kontuzjami, nieobecni podczas więcej niż dwóch pobrań krwi oraz zawodnicy, którzy regularnie stosowali suplementację wapnia lub witaminy D, zostali wykluczeni z badań. Zawodnicy biorący udział w badaniach byli aktywni we wszystkich okresach treningowych, prezentowali zbliżony poziom sportowy oraz realizowali podobne obciążenia wysiłkowe.

Oznaczenie wolnej i biodostępnej 25-(OH)D oraz metabolitów witaminy D zostało wykonane za pomocą metod badawczych opisanych w drugiej publikacji włączonej do jednotematycznego cyklu.

Wykazano istotne zmiany stężenia całkowitej i biodostępnej 25-(OH)D, 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>, 25-(OH)D<sub>3</sub>:24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> i 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>:25-(OH)D<sub>3</sub> pomiędzy pobraniami w trakcie półrocznego cyklu treningowego.

Dokonano także analizy różnic stężeń metabolitów witaminy D, stosunków metabolitów witaminy D i wskaźników stanu przemęczenia w okresach letnim oraz zimowym. W okresie letnim uwzględniono pierwsze trzy pomiary od czerwca do sierpnia, a w okresie zimowym kolejne trzy od października do stycznia. Wyniki badań wskazały statystycznie istotne wyższe stężenia całkowitej, biodostępnej 25-(OH)D, 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>, wartość stosunku 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>:25-(OH)D<sub>3</sub> oraz AST, ALT w okresie letnim w porównaniu do okresu zimowego. W okresie zimowym wykazano statystycznie istotnie wyższe wartości stosunków 25-(OH)D<sub>3</sub>:24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> oraz 25-(OH)D<sub>3</sub>:3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> w porównaniu do okresu letniego.

Analiza statystyczna uwzględniła także sezonowość zmian stężenia VDBP, metabolitów witaminy D, stosunków metabolitów witaminy D oraz wskaźników stanu przemęczenia. Wyniki badań wskazały na znaczący rytm sezonowy dla VDBP, całkowitej i biodostępnej 25-(OH)D, 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>, 25-(OH)D<sub>3</sub>:24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 25-(OH)D<sub>3</sub>:3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>. Nie zaobserwowano istotnego rytmu sezonowego dla wolnej 25-(OH)D i wszystkich oznaczanych wskaźników stanu przemęczenia (ferrytyna, enzymy wątrobowe, CK, hs-CRP, testosteron, kortyzol, stosunek T/C).

Sprawdzono związek pomiędzy stężeniem VDBP, metabolitów witaminy D oraz stosunków metabolitów witaminy D ze wskaźnikami stanu przemęczenia. Analiza wskazała na brak korelacji pomiędzy VDBP, całkowitą, biodostępną i wolną 25-(OH)D metabolitami witaminy D, stosunkami metabolitów witaminy D a ferrytyną, enzymami wątrobowymi (AST, ALT), hs-CRP, CK, kortyzolem, testosteronem i stosunkiem T/C w każdym z badanych okresów treningowych.

Oceniono zmiany w stężeniu metabolitów witaminy D w celu sprawdzenia związku obciążeń wysiłkowych realizowanych w różnych okresach treningowych. Stwierdzono silną statystycznie istotną korelację pomiędzy 25-(OH)D<sub>3</sub> i 24,25-(OH)D<sub>3</sub> w każdym okresie treningowym. Związek między 25-(OH)D<sub>3</sub> i 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> zaobserwowano tylko po okresie przygotowawczym.

Podsumowując, sezonowy rytm stwierdzono dla VDBP, całkowitej i biodostępnej 25-(OH)D, metabolitów witaminy D (24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>,

3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>), stosunków metabolitów witaminy D (25-(OH)D<sub>3</sub>:24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 25-(OH)D<sub>3</sub>:3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>). Nie wykazano natomiast rytmu sezonowego dla wolnej 25-(OH)D oraz wskaźników stanu przemęczenia (ferrytyny, enzymów wątrobowych, hs-CRP, CK, testosteronu, kortyzolu, stosunku T/C). Nie zaobserwowano związku pomiędzy całkowitą, biodostępną, wolną 25-(OH)D, metabolitami i stosunkami metabolitów witaminy D a wskaźnikami stanu przemęczenia. Zależności pomiędzy wolną i całkowitą 25-(OH)D a wskaźnikami stanu przemęczenia nie wskazują jednoznacznie na przewagę pomiarów wolnej frakcji witaminy D nad całkowitą. Wyniki niniejszego badania nie dostarczyły dowodów na to, że wolna i całkowita 25-(OH)D mają związek ze stężeniem testosteronu u zawodników trenujących piłkę nożną w różnych okresach treningowych. Co więcej, wykazano brak wpływu obciążeń wysiłkowych w różnych okresach treningowych na spoczynkowe stężeniem metabolitów witaminy D w tej grupie sportowców.

#### 4.6. Podsumowanie – wkład cyklu prac w dziedzinę nauk medycznych i nauk o zdrowiu (przekaz naukowy i aplikacyjny omawianych prac)

Na podstawie uzyskanych wyników w ramach realizacji cyklu „*Trening sportowy a stężenie metabolitów witaminy D u młodych mężczyzn*” sformułowano następujące wnioski:

- a. Związek pomiędzy witaminą D a funkcją mięśni szkieletowych i możliwościami wysiłkowymi jest złożony i nie można go oceniać poprzez pomiar wyłącznie frakcji całkowitej 25-(OH)D.
- b. Siła związku pomiędzy wolną i całkowitą frakcją 25-(OH)D a zdolnościami wysiłkowymi sportowców trenujących judo i piłkę nożną była podobna. Frakcja wolna nie jest lepszym wskaźnikiem w ocenie metabolizmu witaminy D u mężczyzn o niskim poziomie aktywności fizycznej jak i w grupie zawodników wybranych dyscyplin sportowych.
- c. Wieloletni, regularny trening sportowy nie modyfikuje spoczynkowego stężenia metabolitów witaminy D u zawodników trenujących judo i piłkę nożną.
- d. Uzyskane wyniki badań potwierdzają wcześniejszą sugestię, że lepszym wskaźnikiem do oceny stanu zaopatrzenia organizmu witaminę D u osób zdrowych może być wartość stosunku 24,25-(OH)<sub>2</sub>D do 25-(OH)D niż stężenie całkowitej 25-(OH)D.

Prace uwzględnione ww. cyklu są jednymi z pierwszych, w których badano związek pomiędzy stężeniem metabolitów witaminy D a możliwości wysiłkowymi u zawodników trenujących judo oraz piłkę nożną.

Zaprezentowane wyniki badań pozwoliły na sformułowanie istotnych, z punktu widzenia naukowego i aplikacyjnego, kierunków badań naukowych. Ocena stanu zaopatrzenia organizmu w witaminę D oraz stworzenie indywidualnych protokołów suplementacyjnych cholekalcyferolu może być szczególnie istotne dla sportowców.

**Piśmiennictwo**

1. Alonso, N., Zelzer, S., Eibinger, G., and Herrmann, M. (2022). Vitamin D Metabolites: Analytical Challenges and Clinical Relevance. *Calcified Tissue International*. 112(2):158-177. doi: 10.1007/s00223-022-00961-5.
2. Barger-Lux MJ, Heaney RP, Dowell S, Chen TC, Holick MF. (1998). Vitamin D and its major metabolites: serum levels after graded oral dosing in healthy men. *Osteoporos Int* 8(3): 222-230. doi: 10.1007/s001980050058.
3. Berg, A.H., Powe, C.E., Evans, M.K., Wenger, J., Ortiz, G., Zonderman, A.B. i wsp. (2015). 24,25-Dihydroxyvitamin d3 and vitamin D status of community-dwelling black and white Americans. *Clin Chem* 61(6), 877-884. doi: 10.1373/clinchem.2015.240051.
4. Bikle, D.D., Gee, E., Halloran, B., Kowalski, M.A., Ryzen, E., and Haddad, J.G. (1986). Assessment of the free fraction of 25-hydroxyvitamin D in serum and its regulation by albumin and the vitamin D-binding protein. *J Clin Endocrinol Metab* 63(4), 954-959. doi: 10.1210/jcem-63-4-954.
5. Bikle, D.D., Malmstroem, S., and Schwartz, J. (2017). Current Controversies: Are Free Vitamin Metabolite Levels a More Accurate Assessment of Vitamin D Status than Total Levels? *Endocrinol Metab Clin North Am* 46(4), 901-918. doi: 10.1016/j.ecl.2017.07.013.
6. Bikle, D.D., and Schwartz, J. (2019). Vitamin D Binding Protein, Total and Free Vitamin D Levels in Different Physiological and Pathophysiological Conditions. *Frontiers in Endocrinology* 10(317). doi: 10.3389/fendo.2019.00317.
7. Bikle, D.D. (2021). The Free Hormone Hypothesis: When, Why, and How to Measure the Free Hormone Levels to Assess Vitamin D, Thyroid, Sex Hormone, and Cortisol Status. *JBMR Plus* 5(1), e10418. doi: 10.1002/jbm4.10418.
8. Bischoff, H.A., Borchers, M., Gudat, F., Duermueller, U., Theiler, R., Stähelin, H.B. i wsp. (2001). In situ detection of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor in human skeletal muscle tissue. *Histochem J* 33(1), 19-24. doi: 10.1023/a:1017535728844.
9. Bosworth, C.R., Levin, G., Robinson-Cohen, C., Hoofnagle, A.N., Ruzinski, J., Young, B. i wsp. (2012). The serum 24,25-dihydroxyvitamin D concentration, a marker of vitamin D catabolism, is reduced in chronic kidney disease. *Kidney Int* 82(6), 693-700. doi: 10.1038/ki.2012.193.
10. Brown, A.J., Ritter, C.S., Weiskopf, A.S., Vouros, P., Sasso, G.J., Uskokovic, M.R. i wsp. (2005). Isolation and identification of 1alpha-hydroxy-3-epi-vitamin D3, a potent

- suppressor of parathyroid hormone secretion. *J Cell Biochem* 96(3), 569-578. doi: 10.1002/jcb.20553.
11. Buchheit, M. (2008). The 30-15 intermittent fitness test: accuracy for individualizing interval training of young intermittent sport players. *J Strength Cond Res* 22(2), 365-374. doi: 10.1519/JSC.0b013e3181635b2e.
  12. Caballero-García, A., Córdova-Martínez, A., Vicente-Salar, N., Roche, E., and Pérez-Valdecantos, D. (2021). Vitamin D, Its Role in Recovery after Muscular Damage Following Exercise. *Nutrients* 13(7). doi: 10.3390/nu13072336.
  13. Cashman, K.D., Hayes, A., Galvin, K., Merkel, J., Jones, G., Kaufmann, M. i wsp. (2015). Significance of serum 24,25-dihydroxyvitamin D in the assessment of vitamin D status: a double-edged sword? *Clin Chem* 61(4), 636-645. doi: 10.1373/clinchem.2014.234955.
  14. Cavalier, E., Huyghebaert, L., Rousselle, O., Bekaert, A.C., Kovacs, S., Vranken, L. i wsp. (2020). Simultaneous measurement of 25(OH)-vitamin D and 24,25(OH)<sub>2</sub>-vitamin D to define cut-offs for CYP24A1 mutation and vitamin D deficiency in a population of 1200 young subjects. *Clin Chem Lab Med* 58(2), 197-201. doi: 10.1515/cclm-2019-0996.
  15. Chun, R.F., Peercy, B.E., Orwoll, E.S., Nielson, C.M., Adams, J.S., and Hewison, M. (2014). Vitamin D and DBP: the free hormone hypothesis revisited. *J Steroid Biochem Mol Biol* 144 Pt A, 132-137. doi: 10.1016/j.jsbmb.2013.09.012.
  16. Close, G.L., Russell, J., Copley, J.N., Owens, D.J., Wilson, G., Gregson, W. i wsp. (2013). Assessment of vitamin D concentration in non-supplemented professional athletes and healthy adults during the winter months in the UK: implications for skeletal muscle function. *J Sports Sci* 31(4), 344-353. doi: 10.1080/02640414.2012.733822.
  17. Cooke, N.E., McLeod, J.F., Wang, X.K., and Ray, K. (1991). Vitamin D binding protein: genomic structure, functional domains, and mRNA expression in tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol* 40(4-6), 787-793. doi: 10.1016/0960-0760(91)90304-n.
  18. Dzik, K.P., Kaczor, J.J. (2019) Mechanisms of vitamin D on skeletal muscle function: oxidative stress, energy metabolism and anabolic state. *Eur J Appl Physiol* 119(4):825-839. doi: 10.1007/s00421-019-04104-x.
  19. Dzik, K.P., Grzywacz, T., Łuszczyk, M., Kujach, S., Flis, D.J., and Kaczor, J.J. (2022). Single bout of exercise triggers the increase of vitamin D blood concentration in adolescent trained boys: a pilot study. *Sci Rep* 12(1), 1825. doi: 10.1038/s41598-022-05783-x.

20. Farrokhyar, F., Tabasinejad, R., Dao, D., Peterson, D., Ayeni, O.R., Hadioonzadeh, R., i wsp. (2015). Prevalence of vitamin D inadequacy in athletes: a systematic-review and meta-analysis. *Sports Med* 45(3), 365-378. doi: 10.1007/s40279-014-0267-6.
21. Forney, L.A., Earnest, C.P., Henagan, T.M., Johnson, L.E., Castleberry, T.J., Stewart, L.K. (2014). Vitamin D status, body composition, and fitness measures in college-aged students. *J Strength Cond Res* 28(3), 814-824. doi: 10.1519/JSC.0b013e3182a35ed0.
22. Fraser, W.D., Tang, J.C.Y., Dutton, J.J., Schoenmakers, I. (2020). Vitamin D Measurement, the Debates Continue, New Analytes Have Emerged, Developments Have Variable Outcomes. *Calcif Tissue Int*, 106(1):3-13. doi: 10.1007/s00223-019-00620-2.
23. Fu, L., Yun, F., Oczak, M., Wong, B.Y., Vieth, R., and Cole, D.E. (2009). Common genetic variants of the vitamin D binding protein (DBP) predict differences in response of serum 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] to vitamin D supplementation. *Clin Biochem* 42(10-11), 1174-1177. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2009.03.008.
24. Ginsberg, C., Hoofnagle, A.N., Katz, R., Becker, J.O., Kritchevsky, S.B., Shlipak, M.G. i wsp. (2020). The Vitamin D Metabolite Ratio Is Independent of Vitamin D Binding Protein Concentration. *Clinical Chemistry* 67(2), 385-393. doi: 10.1093/clinchem/hvaa238.
25. Ginsberg, C., Katz, R., de Boer, I.H., Kestenbaum, B.R., Chonchol, M., Shlipak, M.G. i wsp. (2018). The 24,25 to 25-hydroxyvitamin D ratio and fracture risk in older adults: The cardiovascular health study. *Bone* 107, 124-130. doi: 10.1016/j.bone.2017.11.011.
26. Harju, T., Gray, B., Mavroedi, A., Farooq, A., and Reilly, J.J. (2022). Prevalence and novel risk factors for vitamin D insufficiency in elite athletes: systematic review and meta-analysis. *Eur J Nutr* 61(8), 3857-3871. doi: 10.1007/s00394-022-02967-z.
27. Haussler, M.R., Jurutka, P.W., Hsieh, J.C., Thompson, P.D., Selznick, S.H., Haussler, C.A. i wsp. (1995). New understanding of the molecular mechanism of receptor-mediated genomic actions of the vitamin D hormone. *Bone* 17(2 Suppl), 33s-38s. doi: 10.1016/8756-3282(95)00205-r.
28. Herrmann, M., Farrell, C.L., Pusceddu, I., Fabregat-Cabello, N., and Cavalier, E. (2017). Assessment of vitamin D status - a changing landscape. *Clin Chem Lab Med* 55(1), 3-26. doi: 10.1515/cclm-2016-0264.
29. Hewison, M., Burke, F., Evans, K.N., Lammas, D.A., Sansom, D.M., Liu, P., i wsp. (2007). Extra-renal 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase in human health and disease. *J Steroid Biochem Mol Biol* 103(3-5), 316-321. doi: 10.1016/j.jsbmb.2006.12.078.



30. Holick, M.F. (2002). Vitamin D: the underappreciated D-lightful hormone that is important for skeletal and cellular health. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity* 9(1), 87-98.
31. Jastrzębska, M., Kaczmarczyk, M., Michalczyk, M., Radzimiński, Ł., Stępień, P., Jastrzębska, J., et al. (2018). Can Supplementation of Vitamin D Improve Aerobic Capacity in Well Trained Youth Soccer Players? *J Hum Kinet* 61, 63-72. doi: 10.2478/hukin-2018-0033.
32. Jastrzębski, Z. (2016). Effect Of Vitamin D Supplementation On The Level Of Physical Fitness And Blood Parameters Of Rowers During The 8-Week High Intensity Training. *Facicula Educ Fiz Si Sport*. 2014;2:57–67.
33. Jones, G., Prosser, D.E., and Kaufmann, M. (2014). Cytochrome P450-mediated metabolism of vitamin D. *J Lipid Res* 55(1), 13-31. doi: 10.1194/jlr.R031534.
34. Kamao, M., Tatematsu, S., Reddy, G.S., Hatakeyama, S., Sugiura, M., Ohashi, N. i wsp. (2001). Isolation, identification and biological activity of 24R,25-dihydroxy-3-epi-vitamin D3: a novel metabolite of 24R,25-dihydroxyvitamin D3 produced in rat osteosarcoma cells (UMR 106). *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 47(2), 108-115. doi: 10.3177/jnsv.47.108.
35. Koundourakis, N.E., Androulakis, N.E., Malliaraki, N., and Margioris, A.N. (2014). Vitamin D and exercise performance in professional soccer players. *PLoS One* 9(7), e101659. doi: 10.1371/journal.pone.0101659.
36. Książek, A., Zagrodna, A., Dziubek, W., Pietraszewski, B., Ochmann, B., and Słowińska-Lisowska, M. (2016). 25(OH)D(3) Levels Relative to Muscle Strength and Maximum Oxygen Uptake in Athletes. *J Hum Kinet* 50, 71-77. doi: 10.1515/hukin-2015-0144.
37. Książek, A., Dziubek, W., Pietraszewska, J., and Słowińska-Lisowska, M. (2018). Relationship between 25(OH)D levels and athletic performance in elite Polish judoists. *Biol Sport* 35(2), 191-196. doi: 10.5114/biol sport.2018.74195.
38. Lai, J.K., Lucas, R.M., Clements, M.S., Harrison, S.L., Banks E. (2010). Assessing vitamin D status: pitfalls for the unwary. *Mol Nutr Food Res*, 54(8):1062-71. doi: 10.1002/mnfr.200900468.
39. Latham, C.M., Brightwell, C.R., Keeble, A.R., Munson, B.D., Thomas, N.T., Zagzoog, A.M. i wsp. (2021). Vitamin D Promotes Skeletal Muscle Regeneration and Mitochondrial Health. *Frontiers in Physiology* 12. doi: 10.3389/fphys.2021.660498.

40. Lensmeyer, G., Poquette, M., Wiebe, D., Binkley, N. (2012). The C-3 epimer of 25-hydroxyvitamin D(3) is present in adult serum. *J Clin Endocrinol Metab* 97(1): 163-168.
41. Lombardi, G., Vitale, J.A., Logoluso, S., Logoluso, G., Cocco, N., Cocco, G. i wsp. (2017). Circannual rhythm of plasmatic vitamin D levels and the association with markers of psychophysical stress in a cohort of Italian professional soccer players. *Chronobiol Int* 34(4), 471-479. doi: 10.1080/07420528.2017.1297820.
42. Lutsey, P.L., Eckfeldt, J.H., Ogagarue, E.R., Folsom, A.R., Michos, E.D., and Gross, M. (2015). The 25-hydroxyvitamin D3 C-3 epimer: distribution, correlates, and reclassification of 25-hydroxyvitamin D status in the population-based Atherosclerosis Risk in Communities Study (ARIC). *Clin Chim Acta* 442, 75-81. doi: 10.1016/j.cca.2014.12.036.
43. Makris, K., Sempos, C., Cavalier, E. (2020a). The measurement of vitamin D metabolites: part I-metabolism of vitamin D and the measurement of 25-hydroxyvitamin D. *Hormones* 19(2):81-96. doi: 10.1007/s42000-019-00169-7.
44. Makris, K., Sempos, C., and Cavalier, E. (2020b). The measurement of vitamin D metabolites part II—the measurement of the various vitamin D metabolites. *Hormones* 19(2), 97-107. doi: 10.1007/s42000-020-00188-9.
45. Makris, K., Bhattoa, H.P., Cavalier, E., Phinney, K., Sempos, C.T., Ulmer, C.Z., Vasikaran, S.D., Vesper, H., Heijboer, A.C. (2021). Recommendations on the measurement and the clinical use of vitamin D metabolites and vitamin D binding protein - A position paper from the IFCC Committee on bone metabolism. *Clin Chim Acta* 517:171-197. doi: 10.1016/j.cca.2021.03.002.
46. Mieszkowski, J., Stankiewicz, B., Kochanowicz, A., Niespodziński, B., Kowalik, T., Żmijewski, M. i wsp. (2020). Ultra-Marathon-Induced Increase in Serum Levels of Vitamin D Metabolites: A Double-Blind Randomized Controlled Trial. *Nutrients* 12(12). doi: 10.3390/nu12123629.
47. Nemere, I., Wilson, C., Jensen, W., Steinbeck, M., Rohe, B., Farach-Carson, M.C. (2006). Mechanism of 24,25-dihydroxyvitamin D3-mediated inhibition of rapid, 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced responses: Role of reactive oxygen species. *J. Cell. Biochem* 6, 99, 1572–1581.
48. Owens, D.J., Allison, R., and Close, G.L. (2018). Vitamin D and the Athlete: Current Perspectives and New Challenges. *Sports Med* 48(Suppl 1), 3-16. doi: 10.1007/s40279-017-0841-9.

49. Pike, J.W., and Christakos, S. (2017). Biology and Mechanisms of Action of the Vitamin D Hormone. *Endocrinol Metab Clin North Am* 46(4), 815-843. doi: 10.1016/j.ecl.2017.07.001.
50. Płudowski, P., Kos-Kudła, B., Walczak, M., Fal, A., Zozulińska-Ziółkiewicz, D., Sieroszewski, P. i wsp. (2023). Guidelines for Preventing and Treating Vitamin D Deficiency: A 2023 Update in Poland. *Nutrients* 15(3), 695.
51. Powe, C.E., Ricciardi, C., Berg, A.H., Erdenesanaa, D., Collerone, G., Ankers, E. i wsp. (2011). Vitamin D-binding protein modifies the vitamin D-bone mineral density relationship. *J Bone Miner Res* 26(7), 1609-1616. doi: 10.1002/jbmr.387.
52. Powe, C.E., Evans, M.K., Wenger, J., Zonderman, A.B., Berg, A.H., Nalls, M. i wsp. (2013). Vitamin D–Binding Protein and Vitamin D Status of Black Americans and White Americans. *New England Journal of Medicine* 369(21), 1991-2000. doi: 10.1056/NEJMoal306357.
53. Puangthong, C., Sukhong, P., Saengnual, P., Ssrikuea, R., and Chanda, M. (2021). A single bout of high-intensity exercise modulates the expression of vitamin D receptor and vitamin D-metabolising enzymes in horse skeletal muscle. *Equine Vet J* 53(4), 796-805. doi: 10.1111/evj.13346.
54. Seo, E.G., Einhorn, T.A., and Norman, A.W. (1997). 24R,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>: an essential vitamin D<sub>3</sub> metabolite for both normal bone integrity and healing of tibial fracture in chicks. *Endocrinology* 138(9), 3864-3872. doi: 10.1210/endo.138.9.5398.
55. Seo, E.G., and Norman, A.W. (1997). Three-fold induction of renal 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-24-hydroxylase activity and increased serum 24,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> levels are correlated with the healing process after chick tibial fracture. *J Bone Miner Res* 12(4), 598-606. doi: 10.1359/jbmr.1997.12.4.598.
56. Shieh, A., Chun, R.F., Ma, C., Witzel, S., Meyer, B., Rafison, B. i wsp. (2016). Effects of High-Dose Vitamin D<sub>2</sub> Versus D<sub>3</sub> on Total and Free 25-Hydroxyvitamin D and Markers of Calcium Balance. *J Clin Endocrinol Metab* 101(8), 3070-3078. doi: 10.1210/jc.2016-1871.
57. Strathmann, F.G., Sadilkova, K., Laha, T.J., LeSourd, S.E., Bornhorst, J.A., Hoofnagle, A.N. i wsp. (2012). 3-epi-25 hydroxyvitamin D concentrations are not correlated with age in a cohort of infants and adults. *Clin Chim Acta* 413(1-2), 203-206. doi: 10.1016/j.cca.2011.09.028.

58. Sun, X., Cao, Z.B., Taniguchi, H., Tanisawa, K., and Higuchi, M. (2017). Effect of an Acute Bout of Endurance Exercise on Serum 25(OH)D Concentrations in Young Adults. *J Clin Endocrinol Metab* 102(11), 3937-3944. doi: 10.1210/jc.2017-00146.
59. Tang, J.C.Y., Jackson, S., Walsh, N.P., Greeves, J., Fraser, W.D., Ball, N., et al. (2019). The dynamic relationships between the active and catabolic vitamin D metabolites, their ratios, and associations with PTH. *Scientific Reports* 9(1), 6974. doi: 10.1038/s41598-019-43462-6.
60. Vermeulen, A., Verdonck, L., and Kaufman, J.M. (1999). A critical evaluation of simple methods for the estimation of free testosterone in serum. *J Clin Endocrinol Metab* 84(10), 3666-3672. doi: 10.1210/jcem.84.10.6079.
61. Vitale, J.A., Lombardi, G., Cavaleri, L., Graziani, R., Schoenhuber, H., Torre, A. i wsp. (2018). Rates of insufficiency and deficiency of vitamin D levels in elite professional male and female skiers: A chronobiologic approach. *Chronobiol Int* 35(4), 441-449. doi: 10.1080/07420528.2017.1410828.
62. Wyon, M.A., Wolman, R., Nevill, A.M., Cloak, R., Metsios, G.S., Gould, D. i wsp. (2016). Acute Effects of Vitamin D3 Supplementation on Muscle Strength in Judoka Athletes: A Randomized Placebo-Controlled, Double-Blind Trial. *Clin J Sport Med* 26(4), 279-284. doi: 10.1097/jsm.0000000000000264.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

### 5.1. Prace opublikowane przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora

Przed uzyskaniem stopnia doktora opublikowałam 8 prac oryginalnych, w 7 z nich byłam pierwszym autorem oraz autorem korespondencyjnym. Do czasu uzyskania stopnia naukowego doktora mój dorobek wynosił: **IF: 4,363; MEiN: 106.**

Wraz z rozpoczęciem pracy zawodowej w Akademii Wychowania Fizycznego im. Polskich Olimpijczyków we Wrocławiu, moja praca naukowa związana była z realizacją projektów badawczych w Zakładzie Biologicznych i Medycznych Podstaw Sportu dotyczących:

- a. związku pomiędzy stężeniem witaminy D a składem masy ciała (**A1**),
- b. związku pomiędzy stężeniem witaminy D a funkcjonowaniem układu mięśniowego u sportowców (**A2, A3, A4**),
- c. oceny sposobu żywienia osób o różnym poziomie aktywności fizycznej (**A5, A6, A7**),
- d. aktywności fizycznej, stylu życia i sposobem żywienia a stanu semiologicznego i hormonalnego u mężczyzn w wieku 20-35 lat populacji dolnośląskiej (**A8**).

Cztery niżej przedstawione prace dotyczą badań koncentrujących się na witaminie D w grupie zawodników wybranych dyscyplin sportowych. Z czego trzy przedstawione publikacje (**A2, A3, A4**) zostały włączone do monotematycznego cyklu prac stanowiących podstawę mojej rozprawy doktorskiej pod wspólnym tytułem „Stężenie 25(OH)D a wybrane elementy sprawności motorycznej i sztywność mięśni u sportowców”.

Z tego zakresu opublikowałam następujące prace:

**A1. Książek A, Zagrodna A, Pietraszewska J, Słowińska-Lisowska M.** 25(OH)D levels and skinfolds thickness in athletes. *Human Movement*. 2015; vol. 16 (4), 221-224.

**MEiN: 14,0 pkt.**

**A2. Książek A, Zagrodna A, Dziubek W, Pietraszewski B, Ochamn B, Słowińska-Lisowska M.** 25(OH)D3 Levels Relative to Muscle Strength and Maximum Oxygen Uptake in Athletes. *J Hum Kinet*. 2016; 50:71-77. doi: 10.1515/hukin-2015-0144.

**IF: 0,798**

**MEiN: 14,0 pkt.**

**Cytowania: 25**

**A3. Książek A, Kawczyński A, Słowińska-Lisowska M.** Relationship between 25(OH)D levels and skeletal muscle stiffness in athletes—Preliminary study. *Science & Sports*. 2017; 32: 229-234. doi:10.1016/j.scispo.2017.03.002.

**IF: 0,764            MEiN: 15,0 pkt.            Cytowania: 4**

**A4. Książek A, Dziubek W, Pietraszewska J, Słowińska-Lisowska M.** Relationship between 25(OH)D levels and muscle strength and power in elite polish judoists. *Biol Sport*. 2018;35(2):191-196. doi: 10.5114/biolport.2018.74195.

**IF: 2,202            MEiN: 15,0 pkt.            Cytowania: 21**

Pozostałe prace dotyczą oceny sposobu żywienia osób o różnym poziomie aktywności fizycznej (**A5, A6, A7**) oraz związku pomiędzy spożyciem składników pokarmowych a stanem seminologicznym młodych mężczyzn (**A8**).

**A5. Książek A, Kopec A, Słowińska-Lisowska M.** An assessment of diet among high – rank professional judo athletes. *Journal of Combat Sports and Martial Arts*. 2014; 1(2); vol. 5, 37-41.

**MEiN: 7,0 pkt.            Cytowania: 4**

**A6. Książek A, Karpała A, Słowińska-Lisowska M.** An evaluation of diets in the Polish national judo team during the pre-competition weight loss period. *Archives of Budo*, 2017;13, 101-106.

**MEiN: 20,0 pkt.            Cytowania: 4**

**A7. Gajda R, Książek A, Słowińska-Lisowska M.** Poziom aktywności fizycznej kobiet a ilość i skład ich posiłków. *Chemistry. Environment. Biotechnology*. 2017; 20; 51-58.

**MEiN: 5,0 pkt.**

**A8. Książek A, Zagrodna A, Słowińska-Lisowska M, Józków P, Lwow F, Mędraś M.** Diet and Semen Quality in Healthy Males from the Population of the Lower Silesia Region in Poland (the AndroLS Study). *Journal of Men's Health*. 14(1):e24-e31.

**IF: 0,600            MEiN: 15,0 pkt.**

## 5.2. Prace opublikowane po uzyskaniu stopnia naukowego doktora

W niniejszym rozdziale podsumowuję moje pozostałe osiągnięcia naukowe po uzyskaniu stopnia naukowego doktora, na które składa się 7 prac, z czego 6 z nich zostało opublikowanych w czasopiśmie ze wskaźnikiem Impact Factor. W 3 pracach jestem pierwszym autorem, a w 6 z nich autorem korespondującym. Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora, z wyłączeniem jednotematycznego cyklu prac, mój dorobek wynosi: **IF: 26,9; MEiN: 900 pkt.**

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora moje zainteresowania badawcze obejmują następujące obszary:

- a. wielokierunkową rolę witaminy D u młodych mężczyzn o różnym poziomie aktywności fizycznej (**B1, B2**),
- b. ocenę sposobu żywienia i stanu odżywienia sportowców (**B3, B4, B-5**),
- c. metabolizm kostny u mężczyzn w różnym wieku i o różnym poziomie aktywności fizycznej (**B6, B7**).

Z uwagi na obecność receptorów witaminy D w prawie każdej komórce jądrzastej, kalcytriol może wpływać na funkcjonowanie wielu tkanek, narządów i układów, w tym układu immunologicznego i reprodukcyjnego. Z tego względu celem moich badań była ocena związku pomiędzy stężeniem całkowitej 25-(OH)D a wybranymi cytokinami (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1) oraz wskaźnikami hemogramu u zawodników trenujących piłkę nożną (**B1**). Celem drugiej pracy z tego obszaru była ocena wpływu różnych stężeń 25-(OH)D na czynność układu podwzgórze – przysadka mózgowa – gonady, tj. na stężenia hormonów luteinizującego, folikulotropowego, testosteronu całkowitego, wolnego, biodostępnego oraz globuliny wiążącej hormony płciowe u młodych, zdrowych mężczyzn (**B2**).

Z tego zakresu opublikowałam następujące prace:

**B1. Książek A, Zagrodna A, Bohdanowicz-Pawlak A, Lwow F, Słowińska-Lisowska M. Relationships between Vitamin D and Selected Cytokines and Hemogram Parameters in Professional Football Players-Pilot Study. Int J Environ Res Public Health. 2021; 18(13):7124. doi: 10.3390/ijerph18137124.**

**IF: 4,614**

**MEiN: 140 pkt.**

**Cytowania: 5**

**B2. Książek A, Mędraś M, Zagrodna A, Słowińska-Lisowska M, Lwow F.** Correlative studies on vitamin D and total, free bioavailable testosterone levels in young, healthy men. *Sci Rep.* 2021; 11(1):20198. doi: 10.1038/s41598-021-99571-8.

**IF: 4,997**

**MEiN: 140 pkt.**

**Cytowania: 8**

Przedmiotem moich zainteresowań badawczych jest także aspekt związany z żywieniem i suplementacją w sporcie. Prawidłowy sposób żywienia jest ważnym czynnikiem wspierającym efekty treningu, a odpowiednio dobrana strategia żywieniowo – suplementacyjna może korzystnie wpłynąć na zdolności wysiłkowe oraz regenerację powysiłkową sportowców. Z tego względu celem pierwszej pracy z tego obszaru była ocena podaży energii oraz spożycia składników pokarmowych przez zawodników trenujących piłkę nożną na wysokim poziomie sportowym podczas jednego tygodnia okresu przygotowawczego. Poddano weryfikacji ilość spożywanych przez zawodników węglowodanów, w porównaniu do rekomendacji żywieniowych uwzględniających rodzaj realizowanej jednostki treningowej (**B3**).

Jestem również współautorem systematycznego przeglądu piśmiennictwa koncentrującego się na ustaleniu, realizacji przez zawodników trenujących piłkę nożną zaleceń żywieniowych zgodnych z rekomendacjami grupy ekspertów UEFA oraz zidentyfikowaniu obszarów priorytetowych interwencji dietetycznych, biorąc pod uwagę periodyzację treningową oraz zajmowaną przez zawodników pozycję na boisku (**B4**).

Celem kolejnej pracy z tego obszaru była ocena potencjału przeciwutleniającego i przeciwzapalnego spożycia ekstraktu z piersi kurczaka przed wysiłkiem fizycznym jako nowej strategii żywieniowej u osób aktywnych fizycznie (**B5**).

Z tego zakresu opublikowałam następujące prace:

**B3. Książek A, Zagrodna A, Słowińska-Lisowska M.** Assessment of the Dietary Intake of High-Rank Professional Male Football Players during a Preseason Training Week. *Int J Environ Res Public Health.* 2020; 17(22):8567. doi: 10.3390/ijerph17228567.

**IF: 3,390**

**MEiN: 140 pkt.**

**Cytowania: 12**



**B4.** Danielik K, **Książek A**, Zagrodna A, Słowińska-Lisowska M. How Do Male Football Players Meet Dietary Recommendations? A Systematic Literature Review. *Int J Environ Res Public Health*. 2022; 19(15):9561. doi: 10.3390/ijerph19159561.

**MEiN: 140 pkt. Cytowania: 4**

**B5.** Zembron-Lacny A, Wawrzyniak-Gramacka E, **Książek A**, Zagrodna A, Kopeć W, Słowińska-Lisowska M. Dipeptide Extract Modulates the Oxi-Antioxidant Response to Intense Physical Exercise. *Nutrients*. 2022; 14(12):2402. doi: 10.3390/nu14122402.

**IF: 5,900 MEiN: 140 pkt. Cytowania: 1**

Przedmiotem moich zainteresowań badawczych jest także aspekt związany z metabolizmem kostnym u mężczyzn populacji dolnośląskiej. Regularna aktywność fizyczna/wysiłek fizyczny ma istotne znaczenie w budowaniu, utrzymaniu masy kostnej, zapobieganiu jej utracie oraz zwiększeniu gęstości mineralnej kości. Aktywność fizyczna jest czynnikiem pobudzającym tkankę kostną do rozwoju szczytowej masy kostnej w wieku młodzieńczym, zaś u ludzi starszych hamującym rozpad tkanki kostnej. Celem jednej z prac była ocena zależności pomiędzy polimorfizmem genu receptora wapniowego (CASRV1 (rs 1801725), CASRV2 (rs 761486)) a poziomem aktywności fizycznej mężczyzn z terenu Dolnego Śląska (**B6**). Celem drugiej pracy z tego obszaru było sprawdzenie, czy przebiegnięcie maratonu wiąże się ze zmianami stężenia sklerostyny i iPTH u mężczyzn po 50-tym roku życia (**B7**).

**B6.** Zagrodna A, **Książek A**, Słowińska-Lisowska M, Łacmański Ł. Calcium-Sensing Receptor Gene Polymorphisms (CASRV1 and CASRV2) and the Physical Activity Level of Men in Lower Silesia, Poland. *Front Genet*. 2020;11:325. doi: 10.3389/fgene.2020.00325.

**IF: 4,599 MEiN: 100 pkt. Cytowania: 1**

- **B7.** Zagrodna A, **Książek A**, Słowińska-Lisowska M, Chmura J, Ponikowski P, Lombardi G. Effects of running a marathon on sclerostin and parathyroid hormone concentration in males aged over 50. *J Sports Sci*. 2023; 41(8):796-802. doi: 10.1080/02640414.2023.2240618.

**IF: 3,400 MEiN: 100 pkt.**

## 6. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej, w szczególności zagranicznej

### 6.1. Udział w stażach krajowych i zagranicznych

Dokumentacja przedstawiająca potwierdzenie udziału w stażach naukowych znajduje się w załączniku nr 8.

#### a. IRCCS Istituto Ortopedico Galeazzi (Mediolan, Włochy)

**Opiekun stażu:** prof. Giovanni Lombardi, PhD, EuSpLM

W dniach od 31.08 do 14.09.2021 r. przebywałam na stażu naukowym w IRCCS Istituto Ortopedico Galeazzi (Mediolan, Włochy) u profesora Giovanniego Lombardi, który pełni funkcję dyrektora Laboratorium Eksperymentalnej Biochemii i Biologii Molekularnej.

Podczas mojego pobytu w IRCCS miałam możliwość uczestniczenia w badaniach realizowanych w laboratorium takich jak: namnażanie pierwotnych i liniowych komórek ludzkiej trzustki, izolowanie RNA oraz analiza molekularna z zastosowaniem metod PCR, RT-PCR, real-time PCR materiału genetycznego pobranego z tkanki tłuszczowej oraz mięśniowej pacjentów stosujących różne strategie żywieniowe.

Uczestnicząc w stażu naukowym zawiązałam współpracę międzynarodową, która została potwierdzona pierwszą, wspólną publikacją pt. *Relationship Between Metabolites of Vitamin D, Free 25-(OH)D, and Physical Performance in Indoor and Outdoor Athletes (Książek i wsp., 2022 Front Physiol)*.

#### b. Gdański Uniwersytet Medyczny

**Opiekun stażu:** prof. dr hab. med. Jędrzej Antosiewicz

W dniach od 23.05 do 5.06.2022 r. odbyłam krajowy staż naukowy w Gdańskim Uniwersytecie Medycznym pod kierunkiem prof. dr hab. Jędrzeja Antosiewicza.

Podczas mojego pobytu w Gdańskim Uniwersytecie Medycznym uczestniczyłam w działaniach realizowanych w laboratorium takich jak: namnażanie pierwotnych i liniowych komórek raka prostaty, przygotowanie żeli poliakrylamidowych służących do detekcji białek przy użyciu metody WESTERN-BLOT, wykonanie testów ELISA służących do wykrywania i ilościowego oznaczania białek zawartych w surowicy oraz odczytu ich stężenia za pomocą technologii Luminex.

Pobyt w Gdańskim Uniwersytecie Medycznym i udział w konsultacjach z prof. Antosiewiczem zainspirował mnie do złożenia wniosku w ramach konkursu MINIATURA 7 organizowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

**c. IRCCS Istituto Ortopedico Galeazzi (Mediolan, Włochy)**

**Opiekun stażu:** prof. Giovanni Lombardi, PhD, EuSpLM

W dniach od 29.05 do 10.06.2023 r. powtórnie odbywałam zagraniczny staż naukowy w IRCCS Istituto Ortopedico Galeazzi pod opieką profesora Giovanniego Lombardi, z którym miałam okazję uczestniczyć w licznych konsultacjach.

Podczas stażu uczestniczyłam również w realizacji badań w ramach ministerialnego projektu badawczego pt. „Batochine influenzate dall’attività fisica: analisi dei loro effetti sul cross-talk muscolo, osso e tessuto adiposo” (*Eng.* ‘Batokines influenced by physical activity: analysis of their effects on muscle bone and adipose tissue cross-talk’) zarejestrowanego pod numerem L4170. Celem projektu jest zbadanie roli batokin w wymianie między obrotem kostnym i mięśniowym u osób wytrenowanych i niewytrenowanych.

Podczas konsultacji z prof. Lombardi dokonano analizy i interpretacji wyników badań zrealizowanych w ramach grantu wewnętrznego pt. *Witamina D – wolna i całkowita a zdolności wysiłkowe u sportowców*. Ponadto przygotowano publikację do druku pt. *Seasonal changes in free 25-(OH)D and vitamin D metabolite ratios and their relationship with psychophysical stress markers in male professional football players (Książek i wsp., 2023 Front Physiol)*.

**d. Institute of Sport Sciences and Physiotherapy, University of Tartu, Estonia**

**Opiekun stażu:** prof. Vahur Ööpik

W dniach od 12.06. do 18.06.2023 r. przebywałam na wyjeździe treningowym w ramach programu Erasmus+ w Institute of Sport Sciences and Physiotherapy u prof. Vahura Ööpik.

W trakcie mojego pobytu brałam udział w badaniach realizowanych w komorze klimatycznej, ukierunkowanych na oszacowanie wskaźnika potliwości u zawodnika przygotowującego się do ultramaratonu „Badwater 135” w kalifornijskiej Dolinie Śmierci (USA).

W trakcie stażu szkoleniowego wymieniłam także doświadczenia z zakresu badań dotyczących metabolitów witaminy D u sportowców. Efektem konsultacji

z prof. Ööpik było złożenie wniosku w ogłoszonym przez Biuro Współpracy z Zagranicą Polskiej Akademii Nauk naborze do wspólnych projektów wymiany osobowej w ramach współpracy z Estońską Akademią Nauk.

## 6.2. Czynny udział w konferencjach naukowych

Po uzyskaniu stopnia doktora brałam czynny udział w międzynarodowych konferencjach naukowych oraz otrzymałam zaproszenie na wygłoszenie wykładu plenarnego.

- a. **Książek A, Zagrodna A, Słowińska-Lisowska M.** Vitamin D metabolites status, body composition and physical activity in healthy men and athletes. 27th Annual Congress of the European College of Sport Science, 30.08 – 02.09.2022, Sewilla, Hiszpania – **sesja plakatowa oraz krótkie wystąpienie**
- b. **Książek A.** Vitamin D metabolites and physical performance in athletes. Science, Sports and Medicine XI including the International Symposium on Exercise Physiology dedicated to the 90<sup>th</sup> anniversary of Professor Atko-Memme Viru, 8 – 10.09.2022, Tartu, Estonia – **wykład plenarny na zaproszenie**
- c. **Książek A.** Free, bioavailable 25-(OH)D, 1,25-(OH)2D and skinfold thickness in indoor and outdoor athletes. 28th Annual Congress of the European College of Sport Science, 04 – 07.07.2023, Paryż, Francja – **sesja plakatowa oraz krótkie wystąpienie**

## 6.3. Kierownictwo oraz wykonawstwo w projektach naukowych

Po uzyskaniu stopnia doktora otrzymałam dofinansowanie w postaci grantu zewnętrznego oraz wewnętrznego. Finansowanie tych projektów odbywało się po rozstrzygnięciu konkursów na ich finansowanie. Dokumentacja potwierdzająca kierownictwo w grantach została przedstawiona w załączniku nr 8.

### a. Grant zewnętrzny: **MINIATURA 7 – Narodowe Centrum Nauki**

Tytuł: „Stężenie metabolitów tryptofanu jako marker przemęczenia i przetrenowania u profesjonalnych sportowców”

Nr decyzji: DEC-2023/07/X/NZ4/00199

W ramach finansowania przez Narodowe Centrum Nauki zrealizuję pojedyncze działanie badawcze w postaci badań wstępnych, których celem będzie wykazanie,

czy metabolity tryptofanu mogą być markerami przemęczenia/przetrenowania u zawodników na wysokim poziomie sportowym.

**b. Grant wewnętrzny na pojedyncze działanie badawcze – Akademia Wychowania Fizycznego we Wrocławiu**

Tytuł: „Białko wiążące witaminę D a wybrane zdolności wysiłkowe u sportowców”

Nr decyzji: PN/BK/M/2020/04

W ramach grantu wewnętrznego realizowałam staż naukowy w *IRCCS Istituto Ortopedico Galeazzi* (Mediolan, Włochy) pod kierownictwem prof. Giovanniego Lombardi.

**c. Grant wewnętrzny na pojedyncze działanie badawcze – Akademia Wychowania Fizycznego im. Polskich Olimpijczyków we Wrocławiu**

Tytuł: „Ocena związku pomiędzy stężeniem metabolitów witaminy D a cytokin prozapalnych u sportowców”

Nr decyzji: PN/BK/M/2022/01

W ramach grantu wewnętrznego realizowałam staż naukowy w Gdańskim Uniwersytecie Medycznym pod kierownictwem prof. Jędrzeja Antosiewicza.

**d. Grant wewnętrzny na pojedyncze działanie badawcze – Akademia Wychowania Fizycznego im. Polskich Olimpijczyków we Wrocławiu**

Tytuł: „Metabolity witaminy D a zdolności wysiłkowe u sportowców”

Nr decyzji: PN/BK/M/2022/03

W ramach grantu wewnętrznego zrealizowałam staż naukowy w *IRCCS Istituto Ortopedico Galeazzi* (Mediolan, Włochy) pod kierownictwem prof. Giovanniego Lombardi.

**e. Grant wewnętrzny – Akademia Wychowania Fizycznego im. Polskich Olimpijczyków we Wrocławiu – wykonawca**

Tytuł: „Witamina D – wolna i całkowita a zdolności wysiłkowe u sportowców”

Nr decyzji: Z.19.03

Kierownik grantu: prof. Małgorzata Słowińska-Lisowska.

W ramach grantu wewnętrznego zrealizowano projekt badawczy, którego celem była ocena stężenia białka wiążącego witaminę D, wolnej 25-(OH)D i metabolitów witaminy D u nieaktywnych mężczyzn i sportowców. Ponadto oceniono związek wolnej 25-(OH)D, metabolitów witaminy D ze zdolnościami wysiłkowymi

sportowców. W ramach realizacji grantu wewnętrznego powstały 3 prace badawcze, które wchodziły w jednotematyczny cykl publikacji.

#### **6.4. Recenzje dla międzynarodowych czasopism naukowych**

Po uzyskaniu stopnia doktora otrzymałam zaproszenia do recenzowania prac od międzynarodowych czasopism naukowych ze wskaźnikiem oddziaływania Impact Factor.

Wykonałam recenzję dla następujących czasopism:

- a. Nutrients – IF: 5,900 (3 recenzje)
- b. International Journal of Environmental Research and Public Health (1 recenzja)
- c. Biology of Sport – IF: 5,600 (1 recenzja)

### **7. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę**

#### **7.1. Osiągnięcia dydaktyczne i organizacyjne**

- a. Prowadzenie zajęć dydaktycznych w formie ćwiczeń i wykładów:
  - Wydział Wychowania Fizycznego i Sportu Akademii Wychowania Fizycznego im. Polskich Olimpijczyków we Wrocławiu: Żywnienie i suplementacja w sporcie, Żywnienie i suplementacja w aktywności fizycznej, Żywnienie sportowca, Dozwolone wspomaganie wysiłku fizycznego, Dietetyka i wspomaganie.
  - Wydział Fizjoterapii Akademii Wychowania Fizycznego im. Polskich Olimpijczyków we Wrocławiu: Suplementacja w sporcie.
  - Zajęcia dla studentów w ramach programu Erasmus z przedmiotu Sports Nutrition and Supplementation w Akademii Wychowania Fizycznego im. Polskich Olimpijczyków we Wrocławiu.
  - Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu: Fizjologia wysiłku fizycznego z elementami dietetyki sportowej – rok akademicki 2021/2022.
- b. Współtworzenie programu specjalności Żywnienie i suplementacja w sporcie, realizowanej na studiach stacjonarnych i niestacjonarnych na II roku II<sup>o</sup> na kierunku SPORT.

- c. Promotorstwo 19 prac licencjackich i 4 prac magisterskich oraz wykonanie recenzji 55 prac dyplomowych.
- d. Sprawowanie funkcji przewodniczącej komisji egzaminacyjnej do przeprowadzenia egzaminów dyplomowych (licencjackich) na kierunku SPORT Akademii Wychowania Fizycznego im. Polskich Olimpijczyków we Wrocławiu – rok akademicki 2021/2022.
- e. Udział w spotkaniu z Komisją Akredytacyjną w celu scharakteryzowania działań uczelni w zakresie dydaktyki i nauki na kierunku SPORT – rok akademicki 2021/2022.
- f. Członek Komitetu Naukowego Ogólnopolskiej Konferencji dla Młodych Naukowców "Wieczór Naukowca 2022 – Wokół Człowieka".
- g. Bierny udział w konferencjach naukowych i szkoleniach:
  - Narodowe Centrum Nauki: Szkolenie dla wnioskodawców – 15.02.2022 r.
  - Fundacja ScienceWatch Polska: Publikowanie artykułu naukowego w prestiżowym czasopiśmie: wybór czasopisma i komunikacja – 6.04.2022 r.
  - Free Radicals In Biology, Medicine, Sport And Nutrition Conference. In Memory of Prof. Jerzy Popinięgis – 20 – 21.10.2023 r.

## 7.2. Rozdziały (książek/monografii)

Po uzyskaniu stopnia doktora przygotowywałam we współautorstwie rozdziały do książek:

- a. **Książek A**, Zagrodna A, Słowińska-Lisowska M. Regeneracja powysiłkowa; W: *Dietetyka sportowa* / red. nauk. Barbara Frączek, Jarosław Krzywański, Hubert Krysztofiak; Warszawa, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2019; p-ISBN: 978-83-200-5587-0.
- b. **Książek A**, Zagrodna A. Osoby z "niejasną" płcią w sporcie wyczynowym: personalizacja; W: *Zaburzenia rozwoju płci a sport wyczynowy* / red. nauk. Marek Mędraś; Warszawa, PZWL Wydawnictwo Lekarskie, 2022; p-ISBN: 978-83-01-22326-7.
- c. **Książek A**, Zagrodna A. Kobiety w sporcie wyczynowym; W: *Zaburzenia rozwoju płci a sport wyczynowy* / red. nauk. Marek Mędraś; Warszawa, PZWL Wydawnictwo Lekarskie, 2022; p-ISBN: 978-83-01-22326-7.





### 7.3. Osiągnięcia popularyzujące naukę

- a. Udział (jako prowadząca) w szkoleniach z zakresu żywienia i suplementacji w sporcie dla zawodników, trenerów oraz rodziców zawodników:
- Prowadzenie szkolenia w ramach kursu dla Trenerów na poziomie UEFA B organizowanego przez Dolnośląski Związek Piłki Nożnej na temat "Żywienie w sporcie" – 06.12.2019 r.
  - Prowadzenie szkolenia w ramach kursu dla Trenerów na poziomie UEFA A organizowanego przez Dolnośląski Związek Piłki Nożnej na temat "Dieta piłkarza i dozwolone wspomaganie organizmu sportowca" – 02.03.2020 r.
  - Prowadzenie kursu instruktorskiego organizowanego przez Klub Szachowy Polonia Wrocław na temat "Dieta, sport, kondycja jako ważny aspekt w życiu sportowca" – 04.07.2020 r.
  - Prowadzenie kursu dla zawodników Akademii Piłkarskiej Lukam 2010 i ich rodziców na temat "Żywienie młodego zawodnika grającego w piłkę nożną" – 16.10.2020 r.
  - Prowadzenie szkolenia dla zawodników II zespołu klubu MKS „Miedź” Legnica na temat „Doping w sporcie” – 22.03.2023 r.
  - Prowadzenie warsztatów dla zawodników Sportowej Akademii Taekwon-do w Złotoryi na temat „Żywienie w sporcie – podstawowe zasady i zalecenia; wpływ konsumpcji alkoholu na organizm sportowca” oraz „Żywienie okołotreningowe – redukcja masy ciała w sporcie; protokół żywieniowo-suplementacyjny w regeneracji powysiłkowej – 14.11. oraz 21.11.2023 r.

### 7.4. Nagrody oraz wyróżnienia

Po uzyskaniu stopnia doktora otrzymałam nagrody za działalność badawczo-naukową:

- a. Nagroda II<sup>o</sup> JM Rektora AWF we Wrocławiu za zaangażowanie oraz szczególne osiągnięcia w pracy naukowej ze szczególnym uwzględnieniem uzyskania stopnia doktora z wyróżnieniem – 19.10.2018 r.
- b. Nagroda JM Rektora AWF we Wrocławiu za efekty aktywności publikacyjnej w 2018 r. – 28.03.2019 r.

- c. Nagroda I<sup>o</sup> JM Rektora AWF we Wrocławiu za zaangażowanie w prace badawczo-naukowe na rzecz Uczelni w 2019 r. – 18.10.2019 r.
- d. Nagroda JM Rektora i Senatu AWF we Wrocławiu dla młodych naukowców za osiągnięcia naukowe ze szczególnym uwzględnieniem zdobycia najwyższego IF w pojedynczej pracy opublikowanej w 2019 r. – 5.11.2020 r.
- e. Nagroda JM Rektora i Senatu AWF we Wrocławiu dla młodych naukowców – 6.12.2021 r.
- f. Nagroda JM Rektora AWF we Wrocławiu za działalność publikacyjną w 2021 r. – 23.06.2022 r.
- g. Nagroda II<sup>o</sup> JM Rektora AWF we Wrocławiu za największą liczbę cytowań w grupie młodych pracowników – 21.10.2022 r.
- h. Nagroda I<sup>o</sup> JM Rektora AWF we Wrocławiu za największą liczbę cytowań w grupie młodych pracowników – 20.10.2023 r.

#### **7.5. Członkostwo w międzynarodowych towarzystwach naukowych**

Od 2022 r. jestem członkiem European College of Sport Science.

### **8. Dodatkowe informacje dotyczące kariery naukowej i zawodowej**

#### **8.1. Praca zawodowa w ramach opieki dietetycznej w klubie sportowym**

Od 2014 r. nieprzerwanie pracuję w klubie piłkarskim MKS „MIEDŹ” Legnica, sprawując opiekę dietetyczną nad I zespołem. Do moich obowiązków należą między innymi ocena sposobu żywienia zawodników, przygotowywanie protokołów żywieniowo-suplementacyjnych w celu poprawy nawyków żywieniowych, optymalizacji składu masy ciała oraz usprawnienia regeneracji powysiłkowej.

W czasie mojej pracy w klubie zespół dwukrotnie awansował do rozgrywek „Ekstraklasy” w sezonie 2017/2018 oraz 2021/2022.

## Wykaz osiągnięć naukowych, stanowiących znaczny wkład w rozwój określonej dyscypliny

### I. WYKAZ OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH, O KTÓRYCH MOWA W ART. 219 UST. 1. PKT 2 USTAWY

1. Jako osiągnięcie naukowe przedstawiam cykl powiązanych tematycznie 4 artykułów naukowych, zgodnie z art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.), pod wspólnym tytułem:

#### *„Trening sportowy a stężenie metabolitów witaminy D u młodych mężczyzn”*

- **Książek A**, Zagrodna A, Słowińska-Lisowska M. Vitamin D, Skeletal Muscle Function and Athletic Performance in Athletes—A Narrative Review. *Nutrients*. 2019; 11(8):1800. doi: 10.3390/nu11081800.  
**IF: 4,546**      **MEiN: 140 pkt.**
- **Książek A**, Zagrodna A, Słowińska-Lisowska M, Lombardi G. Relationship Between Metabolites of Vitamin D, Free 25-(OH)D, and Physical Performance in Indoor and Outdoor Athletes. *Front Physiol*. 2022; 8;13:909086. doi: 10.3389/fphys.2022.909086.  
**IF: 4,000**      **MEiN: 100 pkt.**
- **Książek A**, Zagrodna A, Lombardi G, Słowińska-Lisowska M. Metabolism of vitamin D is not affected by sport activity. *Clin Chim Acta*. 2023; 548:117507. doi: 10.1016/j.cca.2023.117507.  
**IF: 5,000**      **MEiN: 100 pkt**
- **Książek A**, Zagrodna A, Lombardi G, Słowińska-Lisowska M. Seasonal changes in free 25-(OH)D and vitamin D metabolite ratios and their relationship with psychophysical stress markers in male professional football players. *Front Physiol*. 2023; 16;14:1258678. doi: 10.3389/fphys.2023.1258678.  
**IF: 4,000**      **MEiN: 100 pkt.**

**Podsumowanie:** Dla wskazanego cyklu artykułów sumaryczny wskaźnik Impact Factor (IF) wynosi **17,546**, a łączna liczba punktów, zgodnie z punktacją MEiN wynosi **440**.

## II. WYKAZ AKTYWNOŚCI NAUKOWEJ

1. Wykaz opublikowanych rozdziałów w monografiach naukowych i opracowaniach zbiorowych.

### Okres po uzyskaniu stopnia naukowego doktora

- **Książek A**, Zagrodna A, Słowińska-Lisowska M. Regeneracja powysiłkowa. [w:] Dietetyka sportowa/red. nauk. Barbara Frączek, Jarosław Krzywański, Hubert Krysztofiak. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2019 s. 521-528.

**MEiN: 20 pkt.**

- **Książek A**, Zagrodna A. Osoby z "niejasną" płcią w sporcie wyczynowym: personalizacja. [w:] Zaburzenia rozwoju płci a sport wyczynowy/red. nauk. Marek Mędraś. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2022 s. 111-127.

**MEiN: 20 pkt.**

- **Książek A**, Zagrodna A. Kobiety w sporcie wyczynowym. [w:] Zaburzenia rozwoju płci a sport wyczynowy/red. nauk. Marek Mędraś AW: Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2022 s. 13-15.

**MEiN: 20 pkt.**

2. Wykaz opublikowanych artykułów w czasopismach naukowych (z zaznaczeniem pozycji niewymienionych w pkt I.1).

### Okres przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora

- **Książek A**, Kopeć A, Słowińska-Lisowska M. An assessment of diet among high – rank professional judo athletes. Journal of Combat Sports and Martial Arts. 2014; 1(2); vol. 5, 37-41.

**MEiN: 7,0 pkt.**

- **Książek A**, Zagrodna A, Pietraszewska J, Słowińska-Lisowska M. 25 (OH) D levels and skinfolds thickness in athletes. Human Movement. 2015; vol. 16 (4), 221-224.

**MEiN: 14,0 pkt.**

- **Książek A**, Zagrodna A, Dziubek W, Pietraszewski B, Ochamn B, Słowińska-Lisowska M. 25(OH)D3 Levels Relative to Muscle Strength and Maximum Oxygen Uptake in Athletes. J Hum Kinet. 2016; 50:71-77. doi: 10.1515/hukin-2015-0144.

**IF: 0,798                      MEiN: 14,0 pkt.**

- **Książek A**, Kawczyński A, Słowińska-Lisowska M. Relationship between 25(OH)D levels and skeletal muscle stiffness in athletes–Preliminary study. *Science & Sports*. 2017; 32: 229-234. doi:10.1016/j.scispo.2017.03.002.  
**IF: 0,764 MEiN: 15,0 pkt.**
- Gajda R, **Książek A**, Słowińska-Lisowska M. Poziom aktywności fizycznej kobiet a ilość i skład ich posiłków. *Chemistry. Environment. Biotechnology*. 2017; 20; 51-58.  
**MEiN: 5,0 pkt.**
- **Książek A**, Karpała A, Słowińska-Lisowska M. An evaluation of diets in the Polish national judo team during the pre-competition weight loss period. *Archives of Budo*. 2017; 13, 101-106.  
**MEiN: 20,0 pkt.**
- **Książek A**, Zagrodna A, Słowińska-Lisowska M, Józków P, Lwow F, Mędraś M. Diet and Semen Quality in Healthy Males from the Population of the Lower Silesia Region in Poland (the AndroLS Study). *Journal of Men's Health*, 14(1):e24-e31.  
**IF: 0,600 MEiN: 15,0 pkt.**
- **Książek A**, Dziubek W, Pietraszewska J, Słowińska-Lisowska M. Relationship between 25(OH)D levels and muscle strength and power in elite polish judoists. *Biol Sport*. 2018; 35(2):191-196. doi: 10.5114/biolSport.2018.74195.  
**IF: 2,202 MEiN: 15,0 pkt.**

**Podsumowanie:** Przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora opublikowano 8 prac w czasopismach naukowych o wartości współczynnika wpływu Impact Factor równej **4,363** punktów. Suma punktów MEiN wyniosła **106**.

Okres po uzyskaniu stopnia naukowego doktora

- **Książek A**, Zagrodna A, Słowińska-Lisowska M. Assessment of the Dietary Intake of High-Rank Professional Male Football Players during a Preseason Training Week. *Int J Environ Res Public Health*. 2020; 17(22):8567. doi: 10.3390/ijerph17228567.  
**IF: 3,390 MEiN: 140 pkt.**

- Zagrodna A, **Książek A**, Słowińska-Lisowska M, Łaczmański Ł. Calcium-Sensing Receptor Gene Polymorphisms (CASRV1 and CASRV2) and the Physical Activity Level of Men in Lower Silesia, Poland. *Front Genet.* 2020; 11:325. doi: 10.3389/fgene.2020.00325.  
**IF: 4,599**      **MEiN: 100 pkt.**
- **Książek A**, Mędraś M, Zagrodna A, Słowińska-Lisowska M, Lwow F. Correlative studies on vitamin D and total, free bioavailable testosterone levels in young, healthy men. *Sci Rep.* 2021; 11(1):20198. doi: 10.1038/s41598-021-99571-8.  
**IF: 4,997**      **MEiN: 140 pkt.**
- **Książek A**, Zagrodna A, Bohdanowicz-Pawlak A, Lwow F, Słowińska-Lisowska M. Relationships between Vitamin D and Selected Cytokines and Hemogram Parameters in Professional Football Players-Pilot Study. *Int J Environ Res Public Health.* 2021; 18(13):7124. doi: 10.3390/ijerph18137124.  
**IF: 4,614**      **MEiN: 140 pkt.**
- Zembron-Lacny A, Wawrzyniak-Gramacka E, **Książek A**, Zagrodna A, Kopeć W, Słowińska-Lisowska M. Dipeptide Extract Modulates the Oxi-Antioxidant Response to Intense Physical Exercise. *Nutrients.* 2022; 14(12):2402. doi: 10.3390/nu14122402.  
**IF: 5,900**      **MEiN: 140 pkt.**
- Danielik K, **Książek A**, Zagrodna A, Słowińska-Lisowska M. How Do Male Football Players Meet Dietary Recommendations? A Systematic Literature Review. *Int J Environ Res Public Health.* 2022; 19(15):9561. doi: 10.3390/ijerph19159561.  
**MEiN: 140 pkt.**
- Zagrodna A, **Książek A**, Słowińska-Lisowska M, Chmura J, Ponikowski P, Lombardi G. Effects of running a marathon on sclerostin and parathyroid hormone concentration in males aged over 50. *J Sports Sci.* 2023; 41(8):796-802. doi: 10.1080/02640414.2023.2240618.  
**IF: 3,400**      **MEiN: 100 pkt.**

**Podsumowanie:** Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora opublikowano 7 prac, z wyłączeniem jednotematycznego cyklu publikacji, w czasopismach naukowych o wartości współczynnika wpływu Impact Factor równym **26,900**. Suma punktów MEiN wyniosła **960**.

3. Wykaz wystąpień na krajowych lub międzynarodowych konferencjach naukowych lub artystycznych, z wyszczególnieniem przedstawionych wykładów na zaproszenie i wykładów plenarnych.

Okres przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora

- Eibin K, **Książek A**, Błach W. Przyczyny i rodzaje urazów u zawodników trenujących judo. Uczelniana Konferencja Studenckich Kół Naukowych, Wrocław, 06.06.2011 r. – **wystąpienie ustne.**
- **Książek A**, Kopeć A, Słowińska-Lisowska M. Ocena sposobu żywienia zawodników trenujących judo na wysokim poziomie sportowym. Konferencja Naukowa „Promocja zdrowia i żywienie w zapobieganiu chorobom cywilizacyjnym” Kraków, 25.04.2014 r. – **wystąpienie ustne.**
- **Książek A**, Zagrodna A, Pietraszewska J, Słowińska-Lisowska M. Poziom 25(OH)D3 a skład masy ciała u sportowców. Konferencja Naukowa „Aktywność ruchowa osób niepełnosprawnych” Wrocław, 05 – 06.12.2014 r. – **wystąpienie ustne – wyróżnienie.**
- **Książek A**, Zagrodna A, Dziubek W, Pietraszewski B, Słowińska-Lisowska M. Poziom 25(OH)D a siła mięśniowa oraz  $VO_{2max}$  u sportowców. XXXI Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Medycyny Sportowej „Od profilaktyki do sukcesu sportowego” Zielona Góra, 17 – 19.09.2015 r. – **wystąpienie ustne.**
- **Książek A**, Dziubek W, Pietraszewska J, Słowińska-Lisowska M. Stężenie 25(OH)D a wybrane elementy sprawności motorycznej u zawodników trenujących judo. XXXII Międzynarodowy Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Medycyny Sportowej „80-lecie Medycyny Sportowej w Polsce – Wyzwania na przyszłość” Wrocław, 12 – 14.10.2017 r. – **wystąpienie ustne.**

Okres po uzyskaniu stopnia naukowego doktora

- Marszałek E, **Książek A**. Poziom witaminy D a infekcje górnych dróg oddechowych u sportowców. III Ogólnopolska Konferencja dla Młodych Naukowców "Wieczór Naukowca 2019: wokół człowieka" Wrocław, 23 – 24.05.2019 r. – **wystąpienie ustne.**
- Zagrodna A, **Książek A**, Słowińska-Lisowska M, Zawadzka K, Konefał M, Chmura P, Młynarska K, Kosowski M, Mędraś M, Chmura J, Ponikowski P, Daroszewski J. Ocena stężenia sklerostyny i parathormonu u mężczyzn po przebiegnięciu

maratonu. XXXIII Międzynarodowy Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Medycyny Sportowej, Wrocław, 26 – 28.09.2019 r. – **wystąpienie ustne.**

- **Książek A**, Zagrodna A, Słowińska-Lisowska M. Vitamin D metabolites status, body composition and physical activity in healthy men and athletes. 27th Annual Congress of the European College of Sport Science, Sevilla (Spain), 30.08 – 02.09.2022 r. – **sesja plakatowa oraz krótkie wystąpienie.**
  - Zagrodna A, **Książek A**, Słowińska-Lisowska M. VDBP, Free 25-(OH)D levels and markers of psychophysical stress in professional football players. 27th Annual Congress of the European College of Sport Science, Sevilla (Spain), 30.08 – 02.09.2022 r. – **sesja plakatowa oraz krótkie wystąpienie.**
  - **Książek A.** Vitamin D metabolites and physical performance in athletes. Science, Sport, Medicine XI, Tartu (Estonia), 08 – 10.08.2022 r. – **wykład plenarny na zaproszenie.**
  - **Książek A.** Free, bioavailable 25-(OH)D, 1,25-(OH)<sub>2</sub>D and skinfold thickness in indoor and outdoor athletes. 28th Annual Congress of the European College of Sport Science, Paris (France), 04 – 07.07.2023 r. – **sesja plakatowa oraz krótkie wystąpienie.**
4. Wykaz udziału w komitetach organizacyjnych i naukowych konferencji krajowych lub międzynarodowych, z podaniem pełnionej funkcji.
- Ogólnopolska Konferencja dla Młodych Naukowców "Wieczór Naukowca 2022 r. – Wokół Człowieka" – **członek Komitetu Naukowego.**
5. Wykaz uczestnictwa w pracach zespołów badawczych realizujących projekty finansowane w drodze konkursów krajowych lub zagranicznych, z podziałem na projekty zrealizowane i będące w toku realizacji, oraz z uwzględnieniem informacji o pełnionej funkcji w ramach prac zespołów.

#### Zrealizowane projekty badawcze

- **Wykonawca** w projekcie badawczym finansowanym przez Akademię Wychowania Fizycznego im. Polskich Olimpijczyków we Wrocławiu pt. „Witamina D – wolna i całkowita a zdolności wysiłkowe u sportowców” w ramach wewnętrznego konkursu (Nr decyzji: Z.19.03).  
Kierownik: prof. dr hab. Małgorzata Słowińska-Lisowska
- **Kierownik pojedynczego działania badawczego** finansowanego przez Akademię Wychowania Fizycznego im. Polskich Olimpijczyków we Wrocławiu pt. „Białko



wiążące witaminę D a wybrane zdolności wysiłkowe u sportowców” w ramach wewnętrznego konkursu (Nr decyzji: PN/BK/M/2020/04).

- **Kierownik pojedynczego działania badawczego** finansowanego przez Akademię Wychowania Fizycznego im. Polskich Olimpijczyków we Wrocławiu pt. „Ocena związku pomiędzy stężeniem metabolitów witaminy D a cytokin prozapalnych u sportowców” w ramach wewnętrznego konkursu (Nr decyzji: PN/BK/M/2022/01).
- **Kierownik pojedynczego działania badawczego** finansowanego przez Akademię Wychowania Fizycznego im. Polskich Olimpijczyków we Wrocławiu pt. „Metabolity witaminy D a zdolności wysiłkowe u sportowców” w ramach wewnętrznego konkursu (Nr decyzji: PN/BK/M/2022/03).

Projekty badawcze będące w toku realizacji

- **Kierownik pojedynczego działania badawczego** finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki pt. „Stężenie metabolitów tryptofanu jako marker przemęczenia i przetrenowania u profesjonalnych sportowców” w ramach konkursu **MINIATURA 7** (Nr decyzji: DEC-2023/07/X/NZ4/00199 NCN).
6. Wykaz członkostwa w międzynarodowych lub krajowych organizacjach i towarzystwach naukowych wraz z informacją o pełnionych funkcjach.
- European College of Sport Science – **członek od 2022 r.**
7. Wykaz staży w instytucjach naukowych, w tym zagranicznych, z podaniem miejsca, terminu, czasu trwania stażu i jego charakteru.
- **Wyjazd szkoleniowy w ramach programu Erasmus+**  
Miejsce odbywania szkolenia: Uniwersytet w Porto (Portugalia)  
Opiekun stażu: prof. Ramiro Jose Rolim Marques  
Termin: 17 – 21.09.2018 r. (5 dni)  
Charakter szkolenia: zapoznanie się z funkcjonowaniem jednostki oraz udział w konsultacjach dotyczących oceny sposobu żywienia sportowców
  - **Zagraniczny staż naukowo-badawczy**  
Miejsce odbywania stażu: *IRCCS Istituto Ortopedico Galeazzi* (Mediolan, Włochy)  
Opiekun stażu: prof. Giovanni Lombardi  
Termin: 31.08 – 14.09.2021 r. (14 dni)

Charakter stażu: udział w badaniach laboratoryjnych oraz interpretacja wyników badań uzyskanych w ramach wspólnego projektu badawczego pt. „Wolna i całkowita witamina D a zdolności wysiłkowe u sportowców”

- **Krajowy staż naukowo-badawczy**

Miejsce odbywania stażu: Gdański Uniwersytet Medyczny

Opiekun stażu: prof. dr hab. med. Jędrzeja Antosiewicza

Termin: 23.05 – 05.06.2022 r. (14 dni)

Charakter stażu: udział w badaniach laboratoryjnych oraz konsultacjach dotyczących związku pomiędzy witaminą D a cytokinami prozapalnymi

- **Zagraniczny staż naukowo-badawczy**

Miejsce odbywania stażu: *IRCCS Istituto Ortopedico Galeazzi* (Mediolan, Włochy)

Opiekun stażu: prof. Giovanni Lombardi

Termin: 29.05 – 10.06.2023 r. (14 dni)

Charakter stażu: udział w realizacji badań w ramach ministerialnego projektu badawczego pt. „Batochine influenzate dall’attività fisica: analisi dei loro effetti sul cross-talk muscolo, osso e tessuto adiposo” (Eng. ‘Batokines influenced by physical activity: analysis of their effects on muscle bone and adipose tissue cross-talk’) oraz przygotowanie publikacji naukowej

- **Wyjazd szkoleniowy w ramach programu Erasmus+**

Miejsce odbywania szkolenia: Institute of Sport Sciences and Physiotherapy, University of Tartu (Estonia)

Opiekun stażu: prof. Vahur Ööpik

Termin: 12.06 – 18.06.2023 r. (7 dni)

Charakter szkolenia: zapoznanie się z funkcjonowaniem jednostki oraz udział w konsultacjach w celu opracowania koncepcji wspólnego projektu badawczego dotyczącego oceny stężenia metabolitów witaminy D u osób populacji polskiej i estońskiej

8. Wykaz recenzowanych prac naukowych, w szczególności publikowanych w czasopismach międzynarodowych.

- Nutrients, IF: 5,900 (3 recenzje)
- International Journal of Environmental Research and Public Health (1 recenzja)
- Biology of Sport, IF: 5,600 (1 recenzja)

9. Wykaz udziału w zespołach badawczych, realizujących projekty inne niż określone w pkt. II.5.

Od momentu rozpoczęcia pracy w Akademii Wychowania Fizycznego im. Polskich Olimpijczyków we Wrocławiu realizowałam projekty badawcze finansowane przez Uczelnię:

- Środki w ramach badań statutowych w latach 2014-2016  
Temat: Aktywność fizyczna, styl życia i sposób odżywiania a stan seminologiczny i hormonalny mężczyzn w wieku 20-35 lat populacji dolnośląskiej.
- Środki na badania dla młodych naukowców w 2016 r.  
Temat: Aktywność fizyczna a stan semiologiczny mężczyzn
- Środki na badania dla młodych naukowców w 2017 r.  
Temat: Stężenie 25(OH)D a układ mięśniowy u sportowców

### III. DANE NAUKOMETRYCZNE

#### 1. Impact Factor

Dane wg *Journal Citation Reports*

Impact Factor (IF)	Przed uzyskaniem stopnia doktora	Po uzyskaniu stopnia doktora
Publikacje z monotematycznego cyklu prac	–	17,546
Publikacje spoza cyklu prac	4,363	26,900
Sumaryczny IF	48,809	

#### 2. Liczba cytowań publikacji wnioskodawcy, z oddzielnym uwzględnieniem autocytowań

Dane wg *Web of Science Core Collection*

	Liczba cytowań publikacji według Web of Science Core Collection
Liczba cytowań	147
Liczba cytowań bez autocytowań	131

#### 3. Informacja o posiadanym indeks Hirscha

Dane wg *Web of Science Core Collection*

- Indeks Hirscha według Web of Science (metoda Author Search): 5
- Indeks Hirscha według Web of Science (metoda Cited Reference Search): 5

dr Anna Książek

Sumaryczna wartość wskaźnika Impact Factor*	
Przed uzyskaniem stopnia doktora	4.363
Po uzyskaniu stopnia doktora	44.446
Suma	48.809

\*wg Journal Citation Reports

Liczba cytowań**	Author Search	Cited Reference Search
ogółem	142	147
bez autocytowań	128	131
autocytowania	14	16
<b>Indeks Hirsha</b>	<b>5</b>	<b>5</b>

\*\*wg Web of Science Core Collection.

Liczba cytowań podana została dwoma metodami: Author Search oraz Cited Reference Search

	Liczba punktów za publikacje naukowe zgodnie z wykazami/wytycznymi MEiN/MNiSW/KBN***
Przed uzyskaniem stopnia doktora	106
Po uzyskaniu stopnia doktora	1 400
Suma	1 506

\*\*\*wg Bazy Publikacji Pracowników Akademii Wychowania Fizycznego im. Polskich Olimpijczyków we Wrocławiu

Informacje naukometryczne zawarte w tabelach są zgodne z bazami Journal Citation Reports, Web of Science Core Collection oraz Bazą Publikacji Pracowników Akademii Wychowania Fizycznego im. Polskich Olimpijczyków we Wrocławiu.

Ośrodek Informacji Naukowej  
AWF Wrocław

06.12.2023 *Ułga Książek*

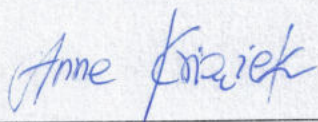
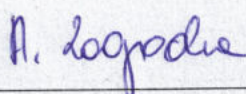

## OŚWIADCZENIE O WSPÓLAUTORSTWIE

**Książek A**, Zagrodna A, Słowińska-Lisowska M. Vitamin D, Skeletal Muscle Function and Athletic Performance in Athletes—A Narrative Review. *Nutrients*. 2019; 11(8):1800.

doi: 10.3390/nu11081800.

Impact Factor: **4,564**, Punktacja MEiN: **140,00**

Niniejszym oświadczamy, że udział merytoryczny poszczególnych współautorów w przygotowaniu tego artykułu był następujący:

AUTOR	UDZIAŁ MERYTORYCZNY*	PODPIS
Anna Książek	ABCDEG	
Aleksandra Zagrodna	FG	
Małgorzata Słowińska-Lisowska	ABFG	

**\*UDZIAŁ MERYTORYCZNY:**

- A- koncepcja pracy
- B- sformułowanie celów pracy
- C- dobór piśmiennictwa
- D- analiza piśmiennictwa
- E- przygotowanie manuskryptu
- F- korekta manuskryptu przed i po otrzymaniu recenzji
- G- zatwierdzenie ostatecznej wersji manuskryptu do publikacji



PODPIS ZAUFANY

ANNA  
KSIĄŻEK

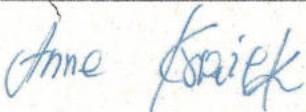
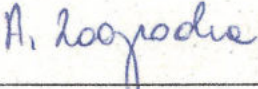


14.12.2023 18:08:58 [GMT+1]  
Dokument podpisany elektronicznie  
podpisem zaufanym

## OŚWIADCZENIE O WSPÓLAUTORSTWIE

**Książek A, Zagrodna A, Słowińska-Lisowska M, Lombardi G.** Relationship Between Metabolites of Vitamin D, Free 25-(OH)D, and Physical Performance in Indoor and Outdoor Athletes. *Front Physiol.* 2022; 8;13:909086. doi: 10.3389/fphys.2022.909086.

Impact Factor: **4,000** Punktacja MEiN: **100,00**

Niniejszym oświadczamy, że udział merytoryczny poszczególnych współautorów w przygotowaniu tego artykułu był następujący:

AUTOR	UDZIAŁ MERYTORYCZNY*	PODPIS
Anna Książek	ABCDEFH	
Aleksandra Zagrodna	ABCDGH	
Małgorzata Słowińska-Lisowska	BGH	
Giovanni Lombardi	ABEGH	

**\*UDZIAŁ MERYTORYCZNY:**

- A- koncepcja projektu badawczego
- B- wybór metodyki badań
- C- realizacja projektu badawczego
- D- tworzenie bazy danych
- E- analiza i interpretacja wyników badań
- F- przygotowanie manuskryptu
- G- korekta manuskryptu przed i po otrzymaniu recenzji
- H- zatwierdzenie ostatecznej wersji manuskryptu do publikacji



PODPIS ZAUFANY

ANNA  
KSIĄŻEK  
14.12.2023 18:05:49 [GMT+1]

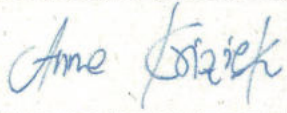
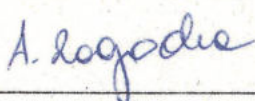


Dokument podpisany elektronicznie  
podpisem zaufanym

## OŚWIADCZENIE O WSPÓLAUTORSTWIE

**Książek A**, Zagrodna A, Lombardi G, Słowińska-Lisowska M. Metabolism of vitamin D is not affected by sport activity. Clin Chim Acta. 2023;548:117507. doi: 10.1016/j.cca.2023.117507.

Impact Factor: **5,000** Punktacja MEiN: **100,00**

Niniejszym oświadczamy, że udział merytoryczny poszczególnych współautorów w przygotowaniu tego artykułu był następujący:

AUTOR	UDZIAŁ MERYTORYCZNY*	PODPIS
Anna Książek	ABCDEFH	
Aleksandra Zagrodna	ABCDGH	
Giovanni Lombardi	ABGH	
Małgorzata Słowińska-Lisowska	ABGH	

**\*UDZIAŁ MERYTORYCZNY:**

A- koncepcja projektu badawczego

B- wybór metodyki badań

C- realizacja projektu badawczego

D- tworzenie bazy danych

E- analiza i interpretacja wyników badań

F- przygotowanie manuskryptu

G- korekta manuskryptu przed i po otrzymaniu recenzji


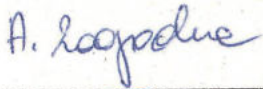


H- zatwierdzenie ostatecznej wersji manuskryptu do publikacji

## OŚWIADCZENIE O WSPÓLAUTORSTWIE

Książek A, Zagrodna A, Lombardi G, Słowińska-Lisowska M. Seasonal changes in free 25-(OH)D and vitamin D metabolite ratios and their relationship with psychophysical stress markers in male professional football players. *Front Physiol.* 2023. 16;14:1258678. doi: 10.3389/fphys.2023.1258678.

Impact Factor: **4,000** Punktacja MEiN: **100,00**

Niniejszym oświadczamy, że udział merytoryczny poszczególnych współautorów w przygotowaniu tego artykułu był następujący:

AUTOR	UDZIAŁ MERYTORYCZNY*	PODPIS
Anna Książek	ABCDEFH	
Aleksandra Zagrodna	ACDGH	
Giovanni Lombardi	ABGH	
Małgorzata Słowińska-Lisowska	ABGH	

**\*UDZIAŁ MERYTORYCZNY:**

A- koncepcja projektu badawczego

B- wybór metodyki badań

C- realizacja projektu badawczego

D- tworzenie bazy danych

E- analiza i interpretacja wyników badań

F- przygotowanie manuskryptu


G- korekta manuskryptu przed i po otrzymaniu recenzji

H- zatwierdzenie ostatecznej wersji manuskryptu do publikacji



Communication

# Vitamin D, Skeletal Muscle Function and Athletic Performance in Athletes—A Narrative Review

Anna Książek \*, Aleksandra Zagrodna and Małgorzata Słowińska-Lisowska

Department of the Biological and Motor Basis of Sport, University School of Physical Education, Wrocław 51612, Poland

\* Correspondence: [anna.ksiazek@awf.wroc.pl](mailto:anna.ksiazek@awf.wroc.pl); Tel.: +48-71-347-35-63

Received: 24 June 2019; Accepted: 2 August 2019; Published: 4 August 2019



**Abstract:** The active form of vitamin D (calcitriol) exerts its biological effects by binding to nuclear vitamin D receptors (VDRs), which are found in most human extraskelatal cells, including skeletal muscles. Vitamin D deficiency may cause deficits in strength, and lead to fatty degeneration of type II muscle fibers, which has been found to negatively correlate with physical performance. Vitamin D supplementation has been shown to improve vitamin D status and can positively affect skeletal muscles. The purpose of this study is to summarize the current evidence of the relationship between vitamin D, skeletal muscle function and physical performance in athletes. Additionally, we will discuss the effect of vitamin D supplementation on athletic performance in players. Further studies are necessary to fully characterize the underlying mechanisms of calcitriol action in the human skeletal muscle tissue, and to understand how these actions impact the athletic performance in athletes.

**Keywords:** 25(OH)D; calcidiol; calcitriol; muscle performance; muscle strength; physical activity; athlete

## 1. Introduction

Recent years have seen an increased interest in the research studies investigating vitamin D status in athletes. The growing number of scientific reports suggests a pleiotropic nature of vitamin D, suggested by the demonstration of vitamin D receptors (VDRs) nearly in every nucleated cell of our bodies. After binding with the membrane and nuclear VDRs, calcitriol may play a number of significant functions in the body, including effects on bone mineralization, normal function of the nervous, immune, endocrine and cardiovascular systems, as well as hormone production [1,2], regulation of the expression of over 900 gene variants [3] and on the normal function of the muscular system [1].

Calcitriol affects osteoblast function through various mechanisms, for example regulation of phosphate homeostasis by increasing the synthesis of fibroblast growth factor 23 (FGF23), and stimulation of mitogen-activated protein kinase signaling, which can improve mechanical load response. Current evidence documents that bone cells can produce 1,25-dihydroxyvitamin D from the 25(OH)D precursor and that this activity may be responsible for the skeletal effects of circulating 25(OH)D. It is well known that athletes have a higher bone mineral density (BMD) compared to people leading a sedentary lifestyle. Any increase in body weight caused by training contributes to the process of bone remodeling and mechanically creates an appropriate bone structure. It is proposed to stimulate musculoskeletal loading through dynamic, high-intensity physical activity to compensate for low levels of 25(OH)D, with poor bone health in athletes. However, unencumbered athletes are susceptible to the same harmful skeletal effects and are more exposed to low BMD when vitamin D deficiency is found [1].

Vitamin D also affects both innate and adaptive immunity. VDRs are found in most cells of the immune system, including Treg cells, neutrophils, dendritic cells, B cells and macrophages [4]. The activation of the immune system can be regulated by circulating 25(OH)D and induced by activation

of the toll-like receptor cascade in the presence of pathogenic bacterial microbiota. Vitamin D has been found to increase gene expression for broad-spectrum antimicrobial peptides (AMPs), which are important regulators of innate immunity. Calcitriol contributes to the immunomodulatory effect on T and B cells in acquired immunity. AMPs are crucial proteins for innate immunity and help defend against acute infections, including influenza and the common cold [1,5]. Differences in vitamin D concentrations may potentially affect the immune response. Studies have shown negative associations between vitamin D levels and the incidence of upper respiratory tract infections (URTI) in athletes especially during high-intensity exercise or prolonged and strenuous training periods [6,7].

Calcitriol activates many metabolic processes in the muscular tissue, exerting its actions via two types of receptors. This results in the stimulation of protein synthesis and an increased number of type II muscle cells, both of which lead to the increased muscle contraction velocity and strength. The combined effect of the activated proteins leads to muscle contraction. Calcitriol also plays an additional role in the proliferation and differentiation of muscle cells, and in the inhibition of their apoptosis [2,4,8]. This may be associated, in a multidirectional and multifactorial manner, with physical performance of athletes. Vitamin D deficiency may contribute to myopathy, decreased muscle tone, and imbalance and degradation of type II muscle fibers. This may have a negative impact on muscle strength, power and work [9,10].

The available literature includes a large number of reports on the assessment of vitamin D status in athletes. Many studies, particularly those conducted during the winter season, showed serum 25(OH)D levels that were below the recommended range [11]. In line with the vitamin D supplementation guidelines, in order to achieve the pleiotropic effects of vitamin D, 25(OH)D values should be maintained at the target level of 30 ng/mL (75 nmol/L) [12]. The appropriate choice of the supplementation dose, which depends on the individual's health status (body weight, age, previous and present illnesses, and ethnicity) allows to reach an optimal serum 25(OH)D concentration and may have beneficial effects on health and performance-related variables.

The aim of this paper is to present the latest evidence on the relationship between vitamin D levels, skeletal muscle function and athletic performance in athletes. Furthermore, we provide evidence on the effect of vitamin D supplementation on physical performance in players.

## 2. Vitamin D and Skeletal Muscle Function

The role of vitamin D in the functioning of the muscle tissue is associated with the large number of VDRs found there [13]. The studies on human skeletal muscles show the presence of VDR in this tissue and confirmed that expression of VDR is crucial for effective uptake of calcitriol by muscle cells [14].  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  may exert its effects on muscles directly and indirectly, via two types of receptors: The nuclear and the membrane receptors. Calcitriol binds to VDR, in what contributes to the conformational changes that allow VDR to interact with a heterodimeric partner, retinoid X receptor (RXR). The  $1,25\text{D-VDR-RXR}$  complex is translocated to the nucleus and binds to vitamin D response elements (VDRE), which finally effects in activation of gene transcription [13,14]. Upon binding with the nuclear receptor, calcitriol affects the cell directly, which results in changes in the gene transcription of mRNA and subsequent de novo protein synthesis. At the nuclear level, the activation of VDR induces the heterodimerization between the active VDR and an orphan steroid receptor known as RXR. The formation of this heterodimer facilitates the interaction between the receptor's zinc finger region with DNA activating the protein transcription process [13,14]. This genomic pathway has been observed to influence the proliferation and differentiation of skeletal muscles and in the inhibition of apoptosis [13,15,16]. A trigger for these phenomena is the acceleration of specific kinases via stimulation of mitogen-activated protein kinase (MAPK). This may result in the proliferation of muscle cells and muscle growth [17].  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  affects the myogenic differentiation protein MYOD1 and myogenic regulatory factors. MYOD1 controls the process of muscle cell differentiation and plays a key role in muscle fiber regeneration by means of increasing their diameter [18].

Upon binding with its membrane receptor, calcitriol affects the cell indirectly, activates several interacting second-messenger pathways, resulting in cellular effects within seconds to minutes confirming  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 's role in modulating muscle contractility [17,19]. This non-genomic pathway has been found to result in an influx of calcium ions into the cell, regulation of the intra- and extracellular levels of this ion, homeostasis of phosphorus-containing compounds and the stimulation of parathyroid hormone (PTH) secretion. The authors suggest that this could increase muscle force, strength and contraction rate [15,17].

In addition, vitamin D decreases the expression of myostatin, while stimulating the formation of follistatin and insulin-like growth factor-2 [2,8,19,20].

Vitamin D may also affect the diameter and number of type II muscle fibers. Vitamin D deficiency has been shown to be able to lead to decrease the concentration of intramyonuclear VDR, VDR gene expression level and contribute to a myopathy caused by type IIA muscle fiber atrophy. Calcitriol stimulates the synthesis of specific muscle proteins, which may result in increased muscle mass and strength. Hypertrophy of type IIB muscle fibers may affect exercise capacity of athletes. It is also noteworthy that type II fibers generate a faster muscle contraction and a greater force compared to type I muscle fibers [14,21]. Hence the ability to perform short high-power exercises such as sprints, jumps, rapid changes of movement, direction or stopping, is closely associated with type II fibers. Vitamin D deficiency may contribute to type II muscle fiber atrophy. This phenomenon is mainly observed in the elderly [4,10,22,23].

### 3. Vitamin D, Athletic Performance and Maximal Oxygen Uptake in Athletes

In the available literature over the past few years, there have been reports on the association of vitamin D with muscle strength and exercise performance in athletes. The results of these studies are inconclusive [1,24–27]. Table 1 lists the characteristics of the included studies.

**Table 1.** Vitamin D, athletic performance and VO<sub>2</sub>max in athletes.

Authors	Study Population	Vitamin D Levels Mean ± SD [ng/mL]	Findings
Dubnov-Raz et al. [28]	n = 80 F + M, professional swimmers	29.49 ± 5.2	No association of 25(OH)D with hand grip strength
Fitzgerald et al. [29]	n = 52 M, professional ice hockey players	35.7 ± 8.9	No association of 25(OH)D levels with the test parameters: VO <sub>2</sub> max, HR, total duration of exercise
Forney et al. [30]	n = 39 F + M, physically active students	36.73 ± 3.2—F 33.02 ± 2.1—M	No association of 25(OH)D levels with the maximal muscle strength Association of 25(OH)D with VO <sub>2</sub> max ( <i>p</i> = 0.018)
Hamilton et al. [31]	n = 342 M, professional football players	21.6 ± 4.3	Athletes with 25(OH)D levels of >30 ng/mL had higher values of peak torque in the non-dominant leg compared to those with 25(OH)D levels of ≤10 ng/mL ( <i>p</i> = 0.015),
Koundourakis et al. [32]	n = 67 M, professional football players	34.4 ± 7.08 after 6 weeks 47.21 ± 13.5	Association of 25(OH)D levels with vertical jump (SJ ( <i>p</i> < 0.001), CMJ ( <i>p</i> < 0.001)), 10 m ( <i>p</i> < 0.001), 20 m sprint times ( <i>p</i> < 0.001), and VO <sub>2</sub> max ( <i>p</i> = 0.006)
Książek et al. [33]	n = 43 M professional football players	16.9 ± 8.4	Athletes with 25(OH)D levels of >20 ng/mL had higher values of peak torque compared to those with 25(OH)D levels of ≤20 ng/mL ( <i>p</i> ≤ 0.05) A statistically significant positive correlation has been shown between 25(OH)D levels and peak torque in the knee joint during extension of the left lower limb (at an angular velocity of 150°/s) ( <i>p</i> ≤ 0.05)
Książek et al. [34]	n = 25 M, elite judo athletes	17.4 ± 5.2	Association of 25(OH)D with hand grip strength ( <i>p</i> ≤ 0.05), power (SJ) ( <i>p</i> ≤ 0.05) and total work ( <i>p</i> ≤ 0.05) measured under isokinetic conditions
Zeitler et al. [35]	n = 284 F, 297 M, healthy recreational athletes	27.2 ± 10.9—F 24.8 ± 10.2—M	M with 25(OH)D levels <20 ng/mL had significantly lower submaximal physical performance measured on a treadmill ergometer than those with normal levels ( <i>p</i> = 0.045) Association of 25(OH)D levels with maximal ( <i>p</i> = 0.003) and submaximal physical performance ( <i>p</i> = 0.002) in M In F no significant differences in maximal and submaximal physical performance were detected

F: female; M: male; VO<sub>2</sub>max: maximal oxygen uptake; HR: heart rate; SJ: squat jump; CMJ: counter movement jump.

No relationship has also been demonstrated between 25(OH)D levels on the one hand and hand grip strength and muscle strength measured under isokinetic conditions, nor vertical jump height in female DanceSport competitors, female gymnasts or female swimmers [36]. This is in contrast to a study conducted by another team, where a statistically significant positive correlation was documented between calcidiol levels and hand grip strength in professional judo athletes. The authors of this study emphasized that the unique features of judo require a considerable hand grip strength, which could point to a relationship between vitamin D levels and strength of the muscle group under investigation [34].

VDRs have also been demonstrated in the myocardium and cardiac conduction tissue [37]. This shows that calcitriol may be associated with maximal oxygen uptake ( $VO_2\text{max}$ ) through oxygen transport ability and oxygen utilization in various tissues [38]. Generally, a positive correlation has been observed between 25(OH)D levels and  $VO_2\text{max}$  in physically inactive individuals [39–41], and studies in professional athletes have been inconclusive. Koundourakis et al. [32] has shown an association of 25(OH)D levels with  $VO_2\text{max}$  in 67 elite football players. Forney et al. [30] studied a group of physically active students and observed that those with vitamin D levels of  $> 35$  ng/mL had significantly higher  $VO_2\text{max}$  levels than those with lower 25(OH)D levels. It is notable that this association was only observed in males. Fitzgerald et al. [29] observed no association of 25(OH)D with  $VO_2\text{max}$  in 52 professional ice hockey players. It should be emphasized that the relationship between vitamin D levels and  $VO_2\text{max}$  is reversely correlated with increased levels of physical activity and fitness level [40].

This may suggest that the relationship between vitamin D and maximal oxygen uptake is more pronounced in individuals who pursue sports for leisure compared to elite professional athletes. The mechanism underlying the  $VO_2\text{max}$  increase by calcitriol is unclear. This may be related to the activation of cytochrome P450 (CYP) activation by 1,25-dihydroxy vitamin D. CYP contains heme as the prosthetic group, which may potentially increase hemoglobin's binding affinity for oxygen [42].

#### **4. Effects of Vitamin D Supplementation on Athletic Performance in Athletes**

The available literature shows that vitamin D supplementation may increase the number of VDRs in muscles, improve muscle performance and lower the risk of bone fracture, although these results have been documented mainly in the elderly [43–45]. The results of studies conducted in athletes are inconclusive. Some of them showed positive effects of vitamin D supplementation on muscle strength and exercise abilities in athletes [46,47], while others did not [48–50]. A detailed list of studies investigating vitamin D supplementation and athletic performance in athletes is presented in Table 2.

**Table 2.** Effects of vitamin D supplementation on athletic performance and VO<sub>2</sub>max in athletes.

Authors	Study Population	Dose of Supplemented Vitamin D	Findings
Close et al. [48]	<i>n</i> = 30 M, professional rugby and football players	20,000 or 40,000 IU/week vs. placebo for 6 or 12 weeks	No association of 25(OH)D with muscle strength and power
Close et al. [46]	<i>n</i> = 61 M, professional football, rugby players, horse racing	5000 IU/day vs. placebo for 8 weeks	Increased vertical jump height ( <i>p</i> = 0.008) and decreased 10 m sprint time ( <i>p</i> = 0.008) in subjects receiving vitamin D supplementation versus placebo
Mitchell [36]	<i>n</i> = 54 F, DanceSport competitors, professional gymnasts and swimmers	50,000 IU/month vs. placebo for 6 weeks	No association of 25(OH)D with hand grip strength, muscle strength measured under isokinetic conditions and vertical jump
Jastrzębski [51]	<i>n</i> = 14 M, professional rowers	6000 IU/day vs. placebo for 8 weeks	Increased VO <sub>2</sub> max levels ( <i>p</i> < 0.05) in athletes receiving vitamin D supplementation compared to the placebo group
Nieman et al. [52]	<i>n</i> = 28 M, NASCAR car race team	3800 IU/day vs. placebo for 6 weeks	No association of 25(OH)D levels with muscle strength measured under isokinetic conditions, vertical jump, maximal force and power measured in the Wingate test
Shanely et al. [49]	<i>n</i> = 33 M, professional football, tennis, lacrosse and baseball players and professional wrestlers	600 IU/day vs. placebo for 6 weeks	No association of 25(OH)D with muscle strength measured under isokinetic conditions or vertical jump
Dubnov-Raz et al. [53]	<i>n</i> = M, adolescent competitive swimmers	2000 IU/day vs. placebo for 12 weeks	No differences of handgrip strength, swimming performance at several speeds between placebo and supplemented group
Wyon et al. [47]	<i>n</i> = 24 F, professional ballet dancers	2000 IU/day vs. placebo for 4 months	Increased isometric force ( <i>p</i> < 0.01) and vertical jump height ( <i>p</i> < 0.01) in athletes receiving vitamin D supplementation compared to the placebo group
Jastrzębska et al. [54]	<i>n</i> = 36 M, well-trained soccer players	5000 IU/day vs. placebo for 8 weeks	No differences of peak power, total work capacity, 5, 10, 20, 30 m sprint running times, SJ, and CMJ between placebo and supplemented group
Jastrzębska et al. [55]	<i>n</i> = 36 M, well-trained soccer players	5000 IU/day vs. placebo for 8 weeks	The supplemented group demonstrated a significant increase in VO <sub>2</sub> max compare to placebo group ( <i>p</i> < 0.0001)
Todd et al. [56]	<i>n</i> = 43 M, football players	3000 IU/day vs. placebo for 12 weeks	No association between 25(OH)D and left/right hand grip strength, CMJ height
Wyon et al. [45]	<i>n</i> = 22 M, judo athletes	150,000 IU once vs. placebo for 8 days	The treatment group demonstrated a significant increase in muscle strength between days 1 and 8 ( <i>p</i> = 0.01)
Fairbairn et al. [50]	<i>n</i> = 57 M, professional rugby union players	50,000 IU once a fortnight vs. placebo for 11–12 weeks	No differences of 30 m sprint time between placebo and supplemented group. The treatment group demonstrated a significant increase in weighted reverse-grip Chin-up 1RM ( <i>p</i> = 0.002). No association between 25(OH)D, bench pull 1RM and bench press 1RM
Skalska et al. [57]	<i>n</i> = 36 M, young soccer players	5000 IU/day vs. placebo for 8 weeks	No differences of physical activity indicators in the supplemented and un-supplemented groups

F: female; M: male; VO<sub>2</sub>max: maximal oxygen uptake; SJ: squat jump; CMJ: counter movement jump; 1RM: one repetition maximum.

A beneficial effect has been demonstrated for an 8-week vitamin D supplementation at a dose of 5000 IU/day on 10 m sprint time and on vertical jump height compared to the placebo group [46]. Similar results have been observed by Wyon et al. [47], who demonstrated that a 4-month vitamin D supplementation increased isometric force and vertical jump height in female DanceSport competitors.

It is now recognized that calcitriol affects muscle function through the regulation of muscle protein synthesis, cell differentiation and cell proliferation, as well as the transport of calcium and phosphate across muscle cell membranes, while modulating phospholipid metabolism. Moreover, vitamin D may regulate mitochondrial function, dynamics and enzyme function in muscle cells [58,59]. Data shows that vitamin D deficiency negatively affects muscle function and contributes to proximal muscle weakness with a reduction in type II muscle fibers [10,13]. Vitamin D supplementation increases muscle fiber size, VDR percent in type II fibers, and the intramyonuclear VDR concentration [44]. Moreover, calcifediol supplementation may have positive effects on muscle strength by increasing mitochondrial function and inhibiting muscle atrophy [60,61]; a statistically significant improvement has been observed in upper and lower limbs, but these results have been obtained in elderly women [60]. This data suggests that a population with low baseline levels of vitamin D or the elderly might benefit more from vitamin D supplementation in terms of its effects on muscle function.

No effect of vitamin D supplementation on muscle power has been shown in the NASCAR car race team [52], nor athletes representing various sports disciplines (football, tennis, lacrosse, wrestling, baseball) [49] and professional rugby and football players [48]. Recent research has shown that there are no observable differences between supplemented and placebo groups under isokinetic conditions in athletes representing various disciplines [36,49], professional football players [56], and competitive swimmers [53]. In other studies of vitamin D, supplementation had no effects on sprint times. Speed abilities did not differ between supplementation and placebo groups for any of the outcome measures [46,50,54].

The mechanisms for the differential effect of vitamin D supplementation on lower and upper limb muscle strength are unclear. It is possible that VDR expression in various muscle groups can contribute to the differential effects between the lower and upper limb muscles [59,62]. Perhaps the methods used to assess the strength of upper limb muscles do not give sufficiently precise results, and thus do not record slight changes in the strength gain in the upper limbs. Moreover, the different methods/assays used to measure vitamin D status may have led to the different serum 25(OH)D values. Based on current evidence, vitamin D supplementation may have a positive effect on lower limb muscle strength in athletes, but no effects have been documented on upper limb muscle force, muscle power and sprint abilities. This might suggest that supplementation of vitamin D differently affects different muscle abilities and muscle groups in athletes.

## 5. Vitamin D Insufficiency and Deficiency in Athletes

In line with the latest guidelines, the normal ranges for serum 25(OH)D levels are defined as 30–50 ng/mL (75–125 nmol/L) or 40–60 ng/mL (100–150 nmol/L). Vitamin D insufficiency is defined as serum levels of 20–30 ng/mL (50–75 nmol/L) and vitamin D deficiency as serum levels below 20 ng/mL (<50 nmol/L) [12]. Lanteri et al. [63] has documented a high prevalence of vitamin D insufficiency and deficiency in athletes. Factors which may inhibit the synthesis of vitamin D in athletes include geographic location, skin pigmentation, indoor training, early- or late-day training and extensive sunscreen use.

A meta-analysis of the literature from 2008 to 2014 evaluated publications reporting a total of 2313 professional athletes. It showed that 56% of the athletes had an inadequate 25(OH)D concentration and that these were significantly lower during the winter period. The studies in question assessed athletes inhabiting areas of high and low levels of insolation. Vitamin D deficits were shown to be common in countries of low levels of insolation. It should, however, be noted that vitamin D deficiency is also found in countries of high levels of insolation, with the risk of insufficient 25(OH)D levels being much higher in the winter and spring periods compared to the autumn and summer periods [11,64].

It should be emphasized that vitamin D synthesis as a result of exposure to sunlight is considerably limited from October to April in areas between 42.2° to 52° N [38].

Athletes training indoor have been shown to have low 25(OH)D levels [6,34]. In general, individuals participating in indoor sports are at a higher risk of vitamin D insufficiency and deficiency, although studies have shown that both groups of athletes had reduced levels of vitamin D [11,65,66]. Lombardi et al. [67] has demonstrated that 32.9% of Italian professional soccer players had insufficient levels of vitamin D and 9% showed vitamin D deficiency. Krzywański et al. [68] studied 409 Polish athletes and found that 80% of those who trained outdoors and 84% of those training indoors had 25(OH)D deficits. Vitale et al. [69] also documented insufficient levels of calcidiol in 50.7% elite professional skiers with 29.6% showing deficient levels.

In cases of vitamin D deficiency, it is important to take into consideration the bioavailability of this vitamin and thus its binding to vitamin D-binding protein (VDBP). VDBP is the main vitamin D carrier. It binds a total of 85–90% of 25(OH)D and 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (the biologically active form of vitamin D) present in the circulation, and the remaining unbound fraction of 25(OH)D is considered bioavailable. Approximately 10–15% of the total quantity of 25(OH)D is bound with albumin, unlike the free amount of 25(OH)D, which is made up of 1% of the total amount vitamin D present in the circulation [70]. As the affinity of albumin for 25(OH)D or 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> is lower than that of VDBP, the bioavailable 25(OH)D is made up of the loosely bound and the free fractions. In humans with a mutated VDBP gene, there may be a considerable interpersonal variation in the amount of bioavailable vitamin D [71]. As a result, differences in the signs and symptoms of vitamin D deficiency may be related to the genetic variation in VDBP [1,72,73]. The VDBP gene is highly polymorphic in various racial groups [1,14,74]. In order to increase the precision and accuracy of vitamin D measurements, we simply need to measure the free fraction of vitamin D, as this measurement is independent of these confounding factors and is therefore much better correlated with pathological conditions [75]. These findings may suggest that vitamin D status is better assessed by measuring free vitamin D and/or its bioavailable 25(OH)D metabolites.

## 6. Conclusions

Further research is necessary to characterize the true vitamin D status by simply measuring free vitamin D rather than total 25(OH)D. Importantly, it may be better to assess the relationship between free vitamin D, skeletal muscle function and exercise ability, to understand how these actions affect athletic performance.

**Author Contributions:** A.K. wrote the manuscript; A.Z. and M.S.-L. reviewed the manuscript; and all authors approved the final manuscript.

**Funding:** The study was funded by the University School of Physical Education, Wrocław.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Owens, D.J.; Allison, R.; Close, G.L. Vitamin D and the athlete: Current perspectives and new challenges. *Sports Med.* **2018**, *48*, 3–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Neal, S.; Sykes, J.; Rigby, M.; Hess, B. A review and clinical summary of vitamin D in regard to bone health and athletic performance. *Phys. Sportsmed.* **2015**, *43*, 161–168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Wang, T.T.; Tavera-Mendoza, L.E.; Laperriere, D.; Libby, E.; MacLeod, N.B.; Nagai, Y.; Bourdeau, V.; Konstorum, A.; Lallemand, B.; Zhang, R.; et al. Large-scale in silico and microarray-based identification of direct 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> target genes. *Mol. Endocrinol.* **2005**, *19*, 2685–2695. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Todd, J.J.; Pourshahidi, L.K.; McSorley, E.M.; Madigan, S.M.; Magee, P.J. Vitamin D: Recent advances and implications for athletes. *Sports Med.* **2015**, *45*, 213–229. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Trochoutsou, A.I.; Kloukina, V.; Samitas, K.; Xanthou, G. Vitamin-D in the immune system: Genomic and non-genomic actions. *Mini Rev. Med. Chem.* **2015**, *15*, 953–963. [[CrossRef](#)]



6. Halliday, T.M.; Peterson, N.J.; Thomas, J.J.; Kleppinger, K.; Hollis, B.W.; Larson-Meyer, D.E. Vitamin D status relative to diet, lifestyle, injury, and illness in college athletes. *Med. Sci. Sports Exerc.* **2011**, *43*, 335–343. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. He, C.S.; Handzlik, M.; Fraser, W.D.; Muhamad, A.; Preston, H.; Richardson, A.; Gleeson, M. Influence of vitamin D status on respiratory infection incidence and immune function during 4 months of winter training in endurance sport athletes. *Exerc. Immunol. Rev.* **2013**, *19*, 86–101.
8. Owens, D.J.; Fraser, W.D.; Close, G.L. Vitamin D and the athlete: Emerging insights. *Eur. J. Sport Sci.* **2015**, *15*, 73–84. [[CrossRef](#)]
9. Dirks-Naylor, A.J.; Lennon-Edwards, S. The effects of vitamin D on skeletal muscle function and cellular signaling. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2011**, *125*, 159–168. [[CrossRef](#)]
10. Sato, Y.; Iwamoto, J.; Kanoko, T.; Satoh, K. Low-dose vitamin D prevents muscular atrophy and reduces falls and hip fractures in women after stroke: A randomized controlled trial. *Cerebrovasc. Dis.* **2005**, *20*, 187–192. Retracted in *Cerebrovasc. Dis.* **2017**, *44*, 240. [[CrossRef](#)]
11. Farrokhyar, F.; Tabasinejad, R.; Dao, D.; Peterson, D.; Ayeni, O.R.; Hadioonzadeh, R.; Bhandari, M. Prevalence of vitamin D inadequacy in athletes: A systematic-review and meta-analysis. *Sports Med.* **2015**, *45*, 365–378. [[CrossRef](#)]
12. Pludowski, P.; Holick, M.F.; Grant, W.B.; Konstantynowicz, J.; Mascarenhas, M.R.; Haq, A.; Povoroznyuk, V.; Balatska, N.; Barbosa, A.P.; Karonova, T.; et al. Vitamin D supplementation guidelines. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2018**, *175*, 125–135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Ceglia, L.; Harris, S.S. Vitamin D and its role in skeletal muscle. *Calcif. Tissue Int.* **2013**, *92*, 151–162. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Dzik, K.P.; Kaczor, J.J. Mechanisms of vitamin D on skeletal muscle function: Oxidative stress, energy metabolism and anabolic state. *Eur. J. Appl. Physiol.* **2019**, *119*, 825–839. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Ceglia, L. Vitamin D and its role in skeletal muscle. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **2009**, *12*, 628–633. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Ceglia, L. Vitamin D and skeletal muscle tissue and function. *Mol. Asp. Med.* **2008**, *29*, 407–414. [[CrossRef](#)]
17. Buitrago, C.; Pardo, V.G.; Boland, R. Role of VDR in 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-dependent non-genomic activation of MAPKs, Src and Akt in skeletal muscle cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2013**, *136*, 125–130. [[CrossRef](#)]
18. Angeline, M.E.; Gee, A.O.; Shindle, M.; Warren, R.F.; Rodeo, S.A. The effects of vitamin D deficiency in athletes. *Am. J. Sports Med.* **2013**, *41*, 461–464. [[CrossRef](#)]
19. Garcia, L.A.; King, K.K.; Ferrini, M.G.; Norris, K.C.; Artaza, J.N. 1,25(OH)<sub>2</sub>vitamin D<sub>3</sub> stimulates myogenic differentiation by inhibiting cell proliferation and modulating the expression of promyogenic growth factors and myostatin in C2C12 skeletal muscle cells. *Endocrinology* **2011**, *152*, 2976–2986. [[CrossRef](#)]
20. Koundourakis, N.E.; Avgoustinaki, P.D.; Malliaraki, N.; Margioris, A.N. Muscular effects of vitamin D in young athletes and non-athletes and in the elderly. *Hormones (Athens)* **2016**, *15*, 471–488. [[CrossRef](#)]
21. Deschenes, M.R.; Brewer, R.E.; Bush, J.A.; McCoy, R.W.; Volek, J.S.; Kraemer, W.J. Neuromuscular disturbance outlasts other symptoms of exercise-induced muscle damage. *J. Neurol. Sci.* **2000**, *174*, 92–99. [[CrossRef](#)]
22. Beavers, K.M.; Beavers, D.P.; Houston, D.K.; Harris, T.B.; Hue, T.F.; Koster, A.; Newman, A.B.; Simonsick, E.M.; Studenski, S.A.; Nicklas, B.J.; et al. Associations between body composition and gait-speed decline: Results from the Health, Aging, and Body Composition study. *Am. J. Clin. Nutr.* **2013**, *97*, 552–560. [[CrossRef](#)]
23. Todd, J.; Madigan, S.; Pourshahidi, K.; McSorley, E.; Laird, E.; Healy, M.; Magee, P. Vitamin D status and supplementation practices in Elite Irish Athletes: An update from 2010/2011. *Nutrients* **2016**, *8*, 485. [[CrossRef](#)]
24. Stockton, K.A.; Mengersen, K.; Paratz, J.D.; Kandiah, D.; Bennell, K.L. Effect of vitamin D supplementation on muscle strength: A systematic review and meta-analysis. *Osteoporos. Int.* **2011**, *22*, 859–871. [[CrossRef](#)]
25. Beaudart, C.; Buckinx, F.; Rabenda, V.; Gillain, S.; Cavalier, E.; Slomian, J.; Petermans, J.; Reginster, J.Y.; Bruyere, O. The effects of vitamin D on skeletal muscle strength, muscle mass, and muscle power: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2014**, *99*, 4336–4345. [[CrossRef](#)]
26. Tomlinson, P.B.; Joseph, C.; Angioi, M. Effects of vitamin D supplementation on upper and lower body muscle strength levels in healthy individuals. A systematic review with meta-analysis. *J. Sci. Med. Sport* **2015**, *18*, 575–580. [[CrossRef](#)]

27. Ainbinder, A.; Boncompagni, S.; Protasi, F.; Dirksen, R.T. Role of Mitofusin-2 in mitochondrial localization and calcium uptake in skeletal muscle. *Cell Calcium* **2015**, *57*, 14–24. [[CrossRef](#)]
28. Dubnov-Raz, G.; Livne, N.; Raz, R.; Rogel, D.; Cohen, A.H.; Constantini, N.W. Vitamin D concentrations and physical performance in competitive adolescent swimmers. *Pediatr. Exerc. Sci.* **2014**, *26*, 64–70. [[CrossRef](#)]
29. Fitzgerald, J.S.; Peterson, B.J.; Warpeha, J.M.; Wilson, P.B.; Rhodes, G.S.; Ingraham, S.J. Vitamin D status and V [combining dot above] O<sub>2</sub> peak during a skate treadmill graded exercise test in competitive ice hockey players. *J. Strength Cond. Res.* **2014**, *28*, 3200–3205. [[CrossRef](#)]
30. Forney, L.A.; Earnest, C.P.; Henagan, T.M.; Johnson, L.E.; Castleberry, T.J.; Stewart, L.K. Vitamin D status, body composition, and fitness measures in college-aged students. *J. Strength Cond. Res.* **2014**, *28*, 814–824. [[CrossRef](#)]
31. Hamilton, B.; Whiteley, R.; Farooq, A.; Chalabi, H. Vitamin D concentration in 342 professional football players and association with lower limb isokinetic function. *J. Sci. Med. Sport* **2014**, *17*, 139–143. [[CrossRef](#)]
32. Koundourakis, N.E.; Androulakis, N.E.; Malliaraki, N.; Margioris, A.N. Vitamin D and exercise performance in professional soccer players. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e101659. [[CrossRef](#)]
33. Ksiazek, A.; Zagrodna, A.; Dziubek, W.; Pietraszewski, B.; Ochmann, B.; Slowinska-Lisowska, M. 25(OH)D<sub>3</sub> Levels Relative to Muscle Strength and Maximum Oxygen Uptake in Athletes. *J. Hum. Kinet.* **2016**, *50*, 71–77. [[CrossRef](#)]
34. Ksiazek, A.; Dziubek, W.; Pietraszewska, J.; Slowinska-Lisowska, M. Relationship between 25(OH)D levels and athletic performance in elite Polish judoists. *Biol. Sport* **2018**, *35*, 191–196. [[CrossRef](#)]
35. Zeitler, C.; Fritz, R.; Smekal, G.; Ekmekcioglu, C. Association Between the 25-Hydroxyvitamin D Status and Physical Performance in Healthy Recreational Athletes. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2018**, *15*, 2724. [[CrossRef](#)]
36. Mitchell, S. The Effects of a Vitamin D Randomised Controlled Trial on Muscle Strength and Power in Female Adolescent Athletes. Master's Thesis, Massey University, Albany, New Zealand, 2013.
37. Reddy Vanga, S.; Good, M.; Howard, P.A.; Vacek, J.L. Role of vitamin D in cardiovascular health. *Am. J. Cardiol.* **2010**, *106*, 798–805. [[CrossRef](#)]
38. Dahlquist, D.T.; Dieter, B.P.; Koehle, M.S. Plausible ergogenic effects of vitamin D on athletic performance and recovery. *J. Int. Soc. Sports Nutr.* **2015**, *12*, 33. [[CrossRef](#)]
39. Mowry, D.A.; Costello, M.M.; Heelan, K.A. Association among cardiorespiratory fitness, body fat, and bone marker measurements in healthy young females. *J. Am. Osteopath. Assoc.* **2009**, *109*, 534–539.
40. Ardestani, A.; Parker, B.; Mathur, S.; Clarkson, P.; Pescatello, L.S.; Hoffman, H.J.; Polk, D.M.; Thompson, P.D. Relation of vitamin D level to maximal oxygen uptake in adults. *Am. J. Cardiol.* **2011**, *107*, 1246–1249. [[CrossRef](#)]
41. Gregory, S.M.; Parker, B.A.; Capizzi, J.A.; Grimaldi, A.S.; Clarkson, P.M.; Moeckel-Cole, S.; Keadle, J.; Chipkin, S.; Pescatello, L.S.; Simpson, K. Changes in vitamin D are not associated with changes in cardiorespiratory fitness. *Clin. Med. Res.* **2013**, *2*, 68–72. [[CrossRef](#)]
42. Sugimoto, H.; Shiro, Y. Diversity and substrate specificity in the structures of steroidogenic cytochrome P450 enzymes. *Biol. Pharm. Bull.* **2012**, *35*, 818–823. [[CrossRef](#)]
43. Dawson-Hughes, B. Vitamin D and muscle function. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2017**, *173*, 313–316. [[CrossRef](#)]
44. Ceglia, L.; Niramitmahapanya, S.; da Silva Morais, M.; Rivas, D.A.; Harris, S.S.; Bischoff-Ferrari, H.; Fielding, R.A.; Dawson-Hughes, B. A randomized study on the effect of vitamin D<sub>3</sub> supplementation on skeletal muscle morphology and vitamin D receptor concentration in older women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2013**, *98*, E1927–E1935. [[CrossRef](#)]
45. Wyon, M.A.; Wolman, R.; Nevill, A.M.; Cloak, R.; Metsios, G.S.; Gould, D.; Ingham, A.; Koutedakis, Y. Acute Effects of Vitamin D<sub>3</sub> Supplementation on Muscle Strength in Judo Athletes: A Randomized Placebo-Controlled, Double-Blind Trial. *Clin. J. Sport Med.* **2016**, *26*, 279–284. [[CrossRef](#)]
46. Close, G.L.; Russell, J.; Copley, J.N.; Owens, D.J.; Wilson, G.; Gregson, W.; Fraser, W.D.; Morton, J.P. Assessment of vitamin D concentration in non-supplemented professional athletes and healthy adults during the winter months in the UK: Implications for skeletal muscle function. *J. Sports Sci.* **2013**, *31*, 344–353. [[CrossRef](#)]

47. Wyon, M.A.; Koutedakis, Y.; Wolman, R.; Nevill, A.M.; Allen, N. The influence of winter vitamin D supplementation on muscle function and injury occurrence in elite ballet dancers: A controlled study. *J. Sci Med. Sport* **2014**, *17*, 8–12. [[CrossRef](#)]
48. Close, G.L.; Leckey, J.; Patterson, M.; Bradley, W.; Owens, D.J.; Fraser, W.D.; Morton, J.P. The effects of Vitamin D<sub>3</sub> supplementation on serum total 25[OH]D concentration and physical performance: A randomised dose-response study. *Br. J. Sports Med.* **2013**, *47*, 692–696. [[CrossRef](#)]
49. Shanely, R.A.; Nieman, D.C.; Knab, A.M.; Gillitt, N.D.; Meaney, M.P.; Jin, F.; Sha, W.; Cialdella-Kam, L. Influence of vitamin D mushroom powder supplementation on exercise-induced muscle damage in vitamin D insufficient high school athletes. *J. Sports Sci.* **2014**, *32*, 670–679. [[CrossRef](#)]
50. Fairbairn, K.A.; Ceelen, I.J.M.; Skeaff, C.M.; Cameron, C.M.; Perry, T.L. Vitamin D<sub>3</sub> supplementation does not improve sprint performance in professional rugby players: A randomized, placebo-controlled, double-blind intervention study. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* **2018**, *28*, 1–9. [[CrossRef](#)]
51. Jastrzębski, Z. Effect of vitamin D supplementation on the level of physical fitness and blood parameters of rowers during the 8-week high intensity training. *Facicula Educ. Fiz și Sport* **2014**, *2*, 57–67.
52. Nieman, D.; Gillitt, N.; Shanely, R.; Dew, D.; Meaney, M.; Luo, B. Vitamin D<sub>2</sub> supplementation amplifies eccentric exercise-induced muscle damage in NASCAR pit crew athletes. *Nutrients* **2014**, *6*, 63–75. [[CrossRef](#)]
53. Dubnov-Raz, G.; Livne, N.; Raz, R.; Cohen, A.H.; Constantini, N.W. Vitamin D supplementation and physical performance in adolescent swimmers. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* **2015**, *25*, 317–325. [[CrossRef](#)]
54. Jastrzebska, M.; Kaczmarczyk, M.; Jastrzebski, Z. Effect of Vitamin D supplementation on training adaptation in well-trained soccer players. *J. Strength Cond. Res.* **2016**, *30*, 2648–2655. [[CrossRef](#)]
55. Jastrzebska, M.; Kaczmarczyk, M.; Michalczyk, M.; Radziminski, L.; Stepien, P.; Jastrzebska, J.; Wakuluk, D.; Suarez, A.D.; Lopez Sanchez, G.F.; Cieszczyk, P.; et al. Can Supplementation of Vitamin D Improve Aerobic Capacity in Well Trained Youth Soccer Players? *J. Hum. Kinet.* **2018**, *61*, 63–72. [[CrossRef](#)]
56. Todd, J.J.; McSorley, E.M.; Pourshahidi, L.K.; Madigan, S.M.; Laird, E.; Healy, M.; Magee, P.J. Vitamin D<sub>3</sub> supplementation using an oral spray solution resolves deficiency but has no effect on VO<sub>2</sub>max in Gaelic footballers: Results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Eur. J. Nutr.* **2017**, *56*, 1577–1587. [[CrossRef](#)]
57. Skalska, M.; Nikolaidis, P.T.; Knechtle, B.; Rosemann, T.J.; Radziminski, L.; Jastrzebska, J.; Kaczmarczyk, M.; Mysliwiec, A.; Dragos, P.; Lopez-Sanchez, G.F.; et al. Vitamin D Supplementation and Physical Activity of Young Soccer Players during High-Intensity Training. *Nutrients* **2019**, *11*, 349. [[CrossRef](#)]
58. Girgis, C.M.; Clifton-Bligh, R.J.; Hamrick, M.W.; Holick, M.F.; Gunton, J.E. The roles of vitamin D in skeletal muscle: Form, function, and metabolism. *Endocr. Rev.* **2013**, *34*, 33–83. [[CrossRef](#)]
59. Zhang, L.; Quan, M.; Cao, Z.B. Effect of vitamin D supplementation on upper and lower limb muscle strength and muscle power in athletes: A meta-analysis. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0215826. [[CrossRef](#)]
60. Iolascon, G.; Moretti, A.; de Sire, A.; Calafiore, D.; Gimigliano, F. Effectiveness of calcifediol in improving muscle function in post-menopausal women: A prospective cohort study. *Adv. Ther.* **2017**, *34*, 744–752. [[CrossRef](#)]
61. Hamilton, B. Vitamin D and human skeletal muscle. *Scand. J. Med. Sci. Sports* **2010**, *20*, 182–190. [[CrossRef](#)]
62. Bischoff-Ferrari, H.A.; Borchers, M.; Gudat, F.; Durmuller, U.; Stahelin, H.B.; Dick, W. Vitamin D receptor expression in human muscle tissue decreases with age. *J. Bone Min. Res.* **2004**, *19*, 265–269. [[CrossRef](#)]
63. Lanteri, P.; Lombardi, G.; Colombini, A.; Banfi, G. Vitamin D in exercise: Physiologic and analytical concerns. *Clin. Chim. Acta* **2013**, *415*, 45–53. [[CrossRef](#)]
64. Kopec, A.; Solarz, K.; Majda, F.; Slowinska-Lisowska, M.; Medras, M. An evaluation of the levels of vitamin d and bone turnover markers after the summer and winter periods in polish professional soccer players. *J. Hum. Kinet.* **2013**, *38*, 135–140. [[CrossRef](#)]
65. Constantini, N.W.; Arieli, R.; Chodick, G.; Dubnov-Raz, G. High prevalence of vitamin D insufficiency in athletes and dancers. *Clin. J. Sport Med.* **2010**, *20*, 368–371. [[CrossRef](#)]
66. Valtuena, J.; Dominguez, D.; Til, L.; Gonzalez-Gross, M.; Drobic, F. High prevalence of vitamin D insufficiency among elite Spanish athletes the importance of outdoor training adaptation. *Nutr. Hosp.* **2014**, *30*, 124–131. [[CrossRef](#)]
67. Lombardi, G.; Vitale, J.A.; Logoluso, S.; Logoluso, G.; Cocco, N.; Cocco, G.; Cocco, A.; Banfi, G. Circannual rhythm of plasmatic vitamin D levels and the association with markers of psychophysical stress in a cohort of Italian professional soccer players. *Chronobiol. Int.* **2017**, *34*, 471–479. [[CrossRef](#)]

68. Krzywanski, J.; Mikulski, T.; Krysztofiak, H.; Mlynczak, M.; Gaczynska, E.; Ziemba, A. Seasonal Vitamin D Status in Polish Elite Athletes in Relation to Sun Exposure and Oral Supplementation. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0164395. [[CrossRef](#)]
69. Vitale, J.A.; Lombardi, G.; Cavaleri, L.; Graziani, R.; Schoenhuber, H.; Torre, A.; Banfi, G. Rates of insufficiency and deficiency of vitamin D levels in elite professional male and female skiers: A chronobiologic approach. *Chronobiol. Int.* **2018**, *35*, 441–449. [[CrossRef](#)]
70. Bikle, D.D.; Gee, E.; Halloran, B.; Kowalski, M.A.; Ryzen, E.; Haddad, J.G. Assessment of the free fraction of 25-hydroxyvitamin D in serum and its regulation by albumin and the vitamin D-binding protein. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1986**, *63*, 954–959. [[CrossRef](#)]
71. Powe, C.E.; Evans, M.K.; Wenger, J.; Zonderman, A.B.; Berg, A.H.; Nalls, M.; Tamez, H.; Zhang, D.; Bhan, I.; Karumanchi, S.A.; et al. Vitamin D-binding protein and vitamin D status of black Americans and white Americans. *N. Engl. J. Med.* **2013**, *369*, 1991–2000. [[CrossRef](#)]
72. Malik, S.; Fu, L.; Juras, D.J.; Karmali, M.; Wong, B.Y.; Gozdzik, A.; Cole, D.E. Common variants of the vitamin D binding protein gene and adverse health outcomes. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **2013**, *50*, 1–22. [[CrossRef](#)]
73. Powe, C.E.; Ricciardi, C.; Berg, A.H.; Erdenesanaa, D.; Collerone, G.; Ankers, E.; Wenger, J.; Karumanchi, S.A.; Thadhani, R.; Bhan, I. Vitamin D-binding protein modifies the vitamin D-bone mineral density relationship. *J. Bone Min. Res.* **2011**, *26*, 1609–1616. [[CrossRef](#)]
74. Brown, A.J.; Coyne, D.W. Bioavailable vitamin D in chronic kidney disease. *Kidney Int.* **2012**, *82*, 5–7. [[CrossRef](#)]
75. Tsuprykov, O.; Chen, X.; Hocher, C.F.; Skoblo, R.; Lianghong, Y.; Hocher, B. Why should we measure free 25(OH) vitamin D? *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2018**, *180*, 87–104. [[CrossRef](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



# Relationship Between Metabolites of Vitamin D, Free 25-(OH)D, and Physical Performance in Indoor and Outdoor Athletes

Anna Książek<sup>1\*</sup>, Aleksandra Zagrodna<sup>1</sup>, Małgorzata Słowińska-Lisowska<sup>1</sup> and Giovanni Lombardi<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Biological and Medical Basis of Sport, Faculty of Physical Education and Sports, Wrocław University of Health and Sport Sciences, Wrocław, Poland, <sup>2</sup>Laboratory of Experimental Biochemistry & Molecular Biology, I.R.C.C.S. Istituto Ortopedico Galeazzi, Milano, Italy, <sup>3</sup>Department of Athletics, Strength and Conditioning, Poznań University of Physical Education, Poznań, Poland

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Hassane Zouhal,  
University of Rennes 2—Upper  
Brittany, France

### Reviewed by:

Jedrezej Antosiewicz,  
Medical University of Gdansk, Poland  
Stephen Paul Ashcroft,  
University of Copenhagen, Denmark

### \*Correspondence:

Anna Książek  
anna.ksiazek@awf.wroc.pl

### Specialty section:

This article was submitted to  
Exercise Physiology,  
a section of the journal  
Frontiers in Physiology

**Received:** 01 April 2022

**Accepted:** 30 May 2022

**Published:** 08 July 2022

### Citation:

Książek A, Zagrodna A,  
Słowińska-Lisowska M and  
Lombardi G (2022) Relationship  
Between Metabolites of Vitamin D,  
Free 25-(OH)D, and Physical  
Performance in Indoor and  
Outdoor Athletes.  
Front. Physiol. 13:909086.  
doi: 10.3389/fphys.2022.909086

The potential effects of vitamin D in athletes have received considerable attention in the literature. However, little is known about vitamin D metabolites and their association with physical performance in athletes. Therefore, the aim of our study was to determine the relationship between metabolites of vitamin D, vitamin D binding protein (VDBP), free, bioavailable 25-(OH)D, and physical fitness tests in athletes. A total of 40 indoor and outdoor players (16 judoists and 24 football players) participated in the study. Vitamin D metabolites (25-(OH)D, 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>, and 1,25-(OH)<sub>2</sub>D) were assessed using LM-MS/MS. Free 25-(OH)D concentration was evaluated by calculation using serum albumin and VDBP levels. Athletic performance was assessed using handgrip and vertical jump. Our study showed a significant correlation between vitamin D metabolites and handgrip strength and vertical jump variables in indoor players. It demonstrated a significant association between 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> and vertical jump parameters in outdoor players. The results of our study showed relationship between free, bioavailable 25-(OH)D, and vertical jump variables in indoor players. In conclusion, we provide novel information on the vitamin D metabolites and athletic performance in athletes. Based on the results of our study, we concluded that vitamin D metabolites might be involved in skeletal muscle function in relation to athletic performance.

**Keywords:** vitamin D, 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 3-epi-25-(OH)D, 1,25(OH)<sub>2</sub>D, VDBP, vertical jump, physical performance

## 1 INTRODUCTION

During the last few decades, interest has increased in vitamin D research because studies frequently evidence vitamin D deficiency/insufficiency among athletes worldwide (Valtueña et al., 2014; Krzywanski et al., 2016; Lombardi et al., 2017). Findings from a meta-analysis of 23 studies, on a total of 2,313 athletes, demonstrated that 56% of those practicing both indoor and outdoor activities had insufficient vitamin D concentrations (Farrokhyar et al., 2015). Further, for athletes living at latitudes above 40°N, the risk of vitamin D inadequacy significantly increases during wintertime (Farrokhyar et al., 2015).

Current studies indicate that vitamin D plays a role in skeletal muscle function. Calcitriol [1α,25-(OH)<sub>2</sub>D] stimulates the myogenic differentiation of mesenchymal stem cells and upregulates the

insulin growth factor (IGF)-II and follistatin expression (Garcia et al., 2011). It downregulates, instead, IGF-I and myostatin protein expression (Di Luigi et al., 2020).  $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}$  can enhance the sensitization of calcium binding sites at the sarcoplasmic reticulum level (Girgis et al., 2013) and influence muscle cell growth and differentiation, particularly of the fast-twitch type II fibers (Halfon et al., 2015). In addition, vitamin D increases insulin sensitivity, energetic substrate metabolism, and oxidative capacity by regulating mitochondrial respiration (Antinozzi et al., 2017; Ashcroft et al., 2020).  $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}$  exerts different non-classic biological effects that are supposed to influence health status, exercise, and sport performance in athletes (Owens et al., 2018).

Recent advances in mass spectrometry (MS)-based detection of plasma metabolites have allowed for the accurate detection of  $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}$ ,  $24,25\text{-(OH)}_2\text{D}$ , a major catabolic metabolite of  $25\text{-(OH)D}$ , and  $3\text{-epi-}25\text{-(OH)D}$ . Although only calcitriol has defined biological activities, there is interest in the other vitamin D metabolites. For instance, studies involving animal models demonstrated that  $24,25\text{-(OH)}_2\text{D}$  exerts a crucial role in the maintenance of bone integrity, healing, and function (Seo et al., 1997; Seo and Norman, 1997). Furthermore,  $24,25\text{-(OH)}_2\text{D}$  modulates growth plate chondrocyte physiology and parathyroid gland function (Herrmann et al., 2017). In turn,  $3\text{-epi-}25\text{-(OH)D}$  levels are directly associated with the cardiovascular risk profile, and  $3\text{-epi-}1\alpha,25\text{(OH)}_2\text{D}$ , a derivative of  $3\text{-epi-}25\text{-(OH)D}$ , effectively reduces blood parathyroid hormone (PTH) without affecting calcium levels (Brown et al., 2005; Lutsey et al., 2015). To our knowledge, there are only few studies, especially intervention ones, related to the status of different vitamin D metabolites (Hassan-Smith et al., 2017; Mieszkowski et al., 2020; Mieszkowski et al., 2021).

Circulating levels of calcidiol [ $25\text{-(OH)D}$ ] are currently used as the indicator of vitamin D status (Bikle et al., 2017; Tsuprykov et al., 2018). Recently, there has been speculation as to whether just measuring total  $25\text{-(OH)D}$  is appropriate for the assessment of vitamin D status in different physiological and pathophysiological conditions (Bikle et al., 2017). Around 85%–90% of the total circulating  $25\text{-(OH)D}$  and  $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}$  is bound to vitamin D binding protein (VDBP). About 10%–15% is bound to albumin, in contrast to free  $25\text{-(OH)D}$  [bioavailable  $25\text{-(OH)D}$ ], which accounts <1% of total circulating vitamin D (Bikle et al., 2017; Owens et al., 2018). According to the “free hormone” hypothesis (Chun et al., 2014), current studies have shown that only the non-bound fraction of vitamin D is able to enter cells and to exert biologic effects (Bikle and Schwartz, 2019). It has been documented that the bioavailable fraction of circulating  $25\text{-(OH)D}$  displays a stronger association with bone mineral density (BMD) than total levels, in healthy adults (Powe et al., 2011), and with intact PTH levels (iPTH) (Shieh et al., 2016).

More recently, the relationships between total  $25\text{-(OH)D}$  concentration and performance-related factors in athletes have been observed in many studies (Seo et al., 2019; Kim et al., 2020; Most et al., 2021; Wilson-Barnes et al., 2021). Although the importance of vitamin D for athletes in regard to health and performance was emphasized, the studies found inconsistent

results. A main issue is represented by the fact that those studies did not consider the metabolites of vitamin D and the amount of free or bioavailable  $25\text{-(OH)D}$ , important to muscle function. Considering the role of vitamin D in skeletal muscle and athletic performance, there is a need to assess such factors among this population. Therefore, the primary aim of our study was to assess circulating vitamin D metabolites, VDBP, free, bioavailable  $25\text{-(OH)D}$  concentration in athletes by considering the behavior of their training, either indoor or outdoor. A secondary aim was to determine the relationship between metabolites of vitamin D, VDBP, free, bioavailable  $25\text{-(OH)D}$ , and physical fitness tests in athletes.

## 2 METHODS

### 2.1 Participants

Forty injury-free male athletes (16 judoists and 24 football players) were included in the study. All participants were Caucasians with white skin, and none of them was a regular sunbed user. None of the subjects used any food supplements containing vitamin D and calcium. Participants' characteristics are shown in **Table 1**. The study was carried out in Wrocław (Poland), which is situated at the latitude of  $51^{\circ}10'$  N. It was conducted during the general preparatory period in the 2<sup>nd</sup> Polish national football team and academic judo team. Athletes within sport discipline had similar exercise loads. Data were collected during 2 weeks at the turn of February and March 2021.

Measurements were performed under the fasting state. Height was measured by an anthropometer accurate to up to  $1\cdot 10^{-3}$  m (GPM Siber Hegner Machinery Ltd., Zurich, Switzerland). The body mass was measured with the use of an electronic scale accurate up to  $10^2$  g (Fawag, Lublin, Poland).

Skinfold thickness was measured at seven sites (biceps, triceps, subscapular, suprailiac, abdominal, thigh, and calf) with a Harpenden skinfold calliper (British Indicators, Burgess Hill, United Kingdom). Each measurement was taken by the same person, 3 times, and the mean value was used for calculation. Percentage body fat was assessed using the formula (Withers et al., 1987; Siri, 1993).

### 2.2 Biochemical Analyses

Athletes were instructed to visit laboratory between 7.00 and 10.00 a.m., after 10-to-12-h fasting and 24-h abstinence from training. Blood samples were collected into plain tubes, containing a clot activator (Vacutest, Kima, Italy). Blood was kept at room temperature for 1 h and then centrifuged at 1300 g, for 10 min, at  $22^{\circ}\text{C}$ . Serum was aliquoted and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until assayed.

iPTH in blood serum was determined by the electrochemiluminescence assay (ECLIA) on an Elecsys analyzer (Roche, Switzerland) according to the manufacturer's protocol and specific assay laboratory quality control procedures. The intra- and inter-assay coefficients of variation (CVs) were 4.5% and 4.8%, respectively, and the limit of detection was at 1.20 pg/mL (0.127 pmol/L).

**TABLE 1 |** Athletes' characteristic and physical performance parameters.

	Mean ± SD		p-value	Cohen's d
	Judoists (n = 16)	Football Players (n = 24)		
Age (years)	22.5 ± 2.9	21.9 ± 3.7	0.56	-0.18
Body weight (kg)	82.1 ± 10.8	78.3 ± 6.2	0.21	-0.46
Height (cm)	181.4 ± 5.0	182.0 ± 5.6	0.71	0.12
Body fat (%)	11.3 ± 2.5	10.8 ± 1.4	0.46	-0.27
Career duration (years)	12.3 ± 1.0	12.4 ± 1.0	0.56	0.19
Training time (h/week)	15.1 ± 1.4	11.0 ± 1.1	<b>&lt;0.001</b>	-3.4
Calcium (mg/dL)	9.97 ± 0.34	9.90 ± 0.44	0.57	-0.18
ACa (mg/dL)	9.36 ± 0.28	9.34 ± 0.36	0.78	-0.08
iPTH (pg/mL)	50.3 ± 17.2	40.2 ± 19.6	0.09	-0.54
Albumin (g/dL)				
Total 25-(OH)D [ng/mL]	19.96 ± 9.31	22.86 ± 8.33	0.32	0.33
25-(OH)D <sub>3</sub> (ng/mL)	19.31 ± 9.27	22.0 ± 8.52	0.36	0.30
25-(OH)D <sub>2</sub> (ng/mL)	0.65 ± 0.35	0.86 ± 0.47	0.12	0.49
24,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> (ng/mL)	1.30 ± 0.91	1.51 ± 0.98	0.49	0.22
3-epi-25-(OH)D <sub>3</sub> (ng/mL)	0.72 ± 0.52	0.92 ± 0.51	0.23	0.39
1,25-(OH) <sub>2</sub> D (pg/mL)	44.69 ± 25.44	40.40 ± 26.97	0.61	-0.16
VDBP (μmol/L)	2.25 ± 0.41	2.48 ± 0.52	0.14	0.47
Free 25-(OH)D M1 (pg/mL)	12.71 ± 6.11	14.07 ± 6.09	0.50	0.22
Free 25-(OH)D M2 (pg/mL)	10.20 ± 4.91	11.45 ± 4.81	0.49	0.22
Bioavailable 25-(OH)D (ng/mL)	4.23 ± 2.04	4.70 ± 1.98	0.54	0.20
Handgrip (kg)				
L	49.6 ± 11.4	41.3 ± 7.5	<b>0.018</b>	-0.89
R	48.8 ± 12.1	44.5 ± 7.4	0.27	-0.40
Jump height (m)	0.38 ± 0.06	0.38 ± 0.04	0.85	-0.07
Peak force (N)	2,173 ± 321	2,017 ± 209	0.10	-0.59
Peak velocity (m/s)	2.85 ± 0.21	2.83 ± 0.14	0.81	-0.09
Peak power (W)	4,535 ± 919	4,289 ± 515	0.35	-0.34
RSImod (m/s)	0.48 ± 0.08	0.47 ± 0.06	0.77	-0.10
Peak force (N/kg)	26.2 ± 1.9	25.6 ± 2.0	0.37	-0.31
Peak power (W/kg)	54.4 ± 6.0	54.4 ± 5.3	0.98	0.01
Peak propulsive force/kg (N/kg)	26.1 ± 1.9	25.6 ± 1.9	0.39	-0.29
AVG propulsive force/kg (N/kg)	20.8 ± 1.2	20.7 ± 1.4	0.94	-0.03
Peak propulsive power/kg (W/kg)	54.2 ± 6.1	54.5 ± 5.3	0.87	0.06
AVG propulsive power/kg (W/kg)	31.5 ± 3.3	31.0 ± 2.7	0.58	-0.19
VO <sub>2max</sub> (ml/kg/min)	50.9 ± 2.1	53.4 ± 3.5	<b>0.02</b>	0.62

Bold values are statistically significant. iPTH, intact parathyroid hormone; L, left; R, right; RSImod, reactive strength index—modified; VDBP, vitamin D binding protein; AVG, average; VO<sub>2max</sub>, maximal oxygen uptake.

Total calcium (Ca) was determined, in serum, by a colorimetric assay using the Konelab 60 system from bioMérieux (France).

Albumin was assayed on a Siemens Dimension Xpand Plus clinical chemistry system (Siemens, Germany).

Albumin-adjusted calcium (ACa) was calculated using the formula

$$ACa = Ca + \left[ \left( 4 - \text{albumin} \left( \frac{g}{dL} \right) \right) * 0.8 \right].$$

## 2.3 Vitamin D Metabolite Levels

The vitamin D metabolite [25-(OH)D<sub>3</sub>, 25-(OH)D<sub>2</sub>, 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>, and 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>] levels were determined by quantitative analysis *via* liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS; QTRAP<sup>®</sup> 4,500 (Sciex) coupled with an ExionLC HPLC system), with minor changes according to a previously published method (Rola et al., 2020).

## 2.4 Free Vitamin D *via* Vitamin D Binding Protein

VDBP was measured by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, R and D Systems, Minneapolis, MN, United States) according to the manufacturer's instructions. The intra-assay CV ranges between 5% and 7%, and the inter-assay CV ranges between 5% and 8%.

The levels of free 25-(OH)D were calculated from total measured 25-(OH)D, VDBP, and serum albumin concentrations by using the equations by Bikle et al. (1986) (Method 1—M1),

$$\text{Free 25-(OH)D} = \frac{\text{total 25-(OH)D}}{1 + (6 \times 10^3 \times \text{albumin}) + (7 \times 10^8 \times \text{VDBP})}$$

Moreover, free, bioavailable 25-(OH)D concentration was calculated using equations adapted from those described by Vermeulen et al. (1999) (Method 2—M2). Vermeulen equations were adapted by replacing the variables for

testosterone, SHBG, and albumin and their respective binding constants with those of 25-(OH)D, VDBP, and albumin,

$$FT = \frac{([T] - (N \times [FT]))}{(K_t \{SHBG - [T] + N[FT]\})}$$

where  $K_t$  is the association constant of SHBG for  $T$  and  $N=KaCa+1$ . This yields a second degree equation that can be solved for either FT or SHBG (Vermeulen et al., 1999).

## 2.5 Physical Fitness Tests

### 2.5.1 Hand Grip Strength

Hand grip strength was measured by a manual dynamometer (T.K.K.5001, Takei Scientific Inst. Co., Ltd., Niigata, Japan) at a resolution of  $10^2$  g and an accuracy of  $5 \cdot 10^2$  g. Prior to testing, each subject was instructed on the correct performance of the measurements. Each subject was asked to comfortably hold the dynamometer with their fingers and palm tight on the device. They then lowered their upper limb along the trunk, while keeping a certain distance, so that neither the elbow nor the hand touched the body, and gripped the dynamometer using maximum muscle power. Throughout the test, subjects were asked to stand with their feet apart and the other upper limb freely along the body. Measurements were taken in kilograms (kg).

### 2.5.2 Vertical Jump

The maximum power, force, velocity, reactive strength index—modified (RSImod), and propulsive force/power of the lower limbs were determined by the vertical jump test using a dual single-axis force platform system (Pasco PS 2141 plates, Pasco Scientific Inc., Roseville, CA, United States) with a sampling frequency of 1,000 Hz, unfiltered (Owen et al., 2014). Participants were instructed to stand with one foot on each platform with their hands on their hips. Athletes were asked to stand still for a period of 3 s to allow the system to ascertain body weight and the onset of movement threshold (Owen et al., 2014; McMahan et al., 2018). Once the system had recorded body weight, the participant was instructed to jump as high as possible while keeping their hands on their hips. For each jump, the athlete was required to return to the “quiet standing” position with the hands remaining on the hips. Three attempts were given for each athlete.

### 2.5.3 Aerobic Fitness

Aerobic fitness was determined using standardized 30–15 intermittent fitness test (30-15IFT). The test consisted of 30 s of shuttle runs with 15 s of passive recovery (Buchheit, 2008). The test starting velocity was set at 8 km/h, and the speed was increased by 0.5 km/h every 30 s. Participants run back and forth between two lines (40 m apart) at a pace directed by a pre-recorded audible signal. Subjects ran until voluntary exhaustion or when subjects could no longer maintain the required running speed were asked to stop the test. The distance covered at that point was recorded as the test result.

## 2.6 Statistical Analysis

Descriptive statistics were presented using mean standard deviations. The normality of data was assessed using the Shapiro–Wilk test and homogeneity of variance using the

Levene test. The difference in athletes’ characteristic and physical performance tests between both groups of athletes was analyzed using the Welch two sample  $t$ -test.

In addition, the effect size was determined by Cohen’s  $d$  with 95% confidence interval. The effect size was defined as small if  $< 0.2$ , medium if between 0.2 and 0.5, large if between 0.5 and 0.8, and very large if  $> 0.8$ .

Multiple regression was performed to analyze association between iPTH, Ca, Aca, and vitamin D metabolites levels. Moreover, we used this analysis to check relationship between vitamin D metabolites levels and athletic performance. Statistically significant models were adjusted for age, body mass, and body fat.

All analyses were performed with R for Windows, version 4.1 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).  $p < 0.05$  was selected as the significance threshold.

## 3 RESULTS

We included forty participants in this study. Athletes competed in two sport’s discipline: judo (classified as indoor) and football (classified as outdoor) (Table 1). Indoor athletes’ weekly training hours were significantly higher than outdoor ( $15.1 \pm 1.4$  vs.  $11.0 \pm 1.1$  h,  $p < 0.001$ ).  $VO_{2max}$  was significantly higher in outdoor than in indoor players ( $53.4 \pm 3.5$  vs.  $50.9 \pm 2.1$  ml/kg/min,  $p < 0.02$ ).

Assuming serum total 25-(OH)D levels in the range of 30–50 ng/mL to be the physiological norm 17.5% ( $n = 7$ ) of athletes achieved this level. We found that 42.5% ( $n = 17$ ) of the participants had a total 25-(OH)D concentration of below 20 ng/ml, which is defined as vitamin D deficiency (Table 1) (Pludowski et al., 2018).

There was no statistical difference in vitamin D metabolites [total 25-(OH)D, 25-(OH)D<sub>3</sub>, 25-(OH)D<sub>2</sub>, 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>, 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>], VDBP, free 25-(OH)D (M1, M2), and bioavailable 25-(OH)D between the indoor and outdoor player group (Table 1).

Handgrip strength (L) was higher in judoists ( $p = 0.018$ ) than in football players. There were no changes observed between groups for handgrip strength (R), vertical jump parameters, and  $VO_{2max}$  (Table 1).

Multiple regression analyses demonstrated association between iPTH, Ca, Aca, and vitamin D metabolites, VDBP, free (M1, M2), and bioavailable 25-(OH)D in both groups with no intergroup differences.

We performed multiple regression analyses to explore possible association between vitamin D metabolites and the athletic performance parameters in indoor (Table 2) and outdoor players (Table 3). Furthermore, we performed multiple regression analysis also to determine relationship between VDBP, free (M1, M2), bioavailable 25-(OH)D, and the physical fitness tests for both groups (Table 4).

Table 2 presents the association of vitamin D metabolites with athletic performance by multiple regression analyses in indoor players. Multiple regression analysis demonstrated that total 25-(OH)D, 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, and 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> were significantly associated with jump height, peak velocity, peak power, RSImod,



**TABLE 2 |** Association of athletic performance with vitamin D metabolites by multiple regression analyses\* in indoor players ( $n = 16$ ).

Physical fitness test variables	Total 25-(OH)D (ng/mL)		24,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> (ng/mL)		3-epi-25-(OH)D <sub>3</sub> (ng/mL)		1,25(OH) <sub>2</sub> D (pg/ml)	
	$\beta$ (95% CI)	$p$ -value	$\beta$ (95% CI)	$p$ -value	$\beta$ (95% CI)	$p$ -value	$\beta$ (95% CI)	$p$ -value
VO <sub>2max</sub> (ml/kg/min)	0.194 (-0.447-0.835)	0.55	0.173 (-0.470-0.817)	0.60	0.050 (-0.602-0.703)	0.88	-0.373 (-0.980-0.233)	0.23
Handgrip strength L (kg)	0.456 (-0.010-0.923)	0.055	0.305 (-0.194-0.804)	0.23	0.615 (0.202-1.028)	<b>0.004</b>	-0.338 (-0.831-0.155)	0.18
Handgrip strength R (kg)	0.461 (-0.003-0.926)	0.052	0.415 (-0.061-0.892)	0.088	0.612 (0.198-1.026)	<b>0.004</b>	-0.480 (-0.939-0.020)	<b>0.041</b>
Jump height (cm)	0.540 (0.099-0.980)	<b>0.016</b>	0.550 (0.113-0.990)	<b>0.014</b>	0.701 (0.327-1.074)	<b>&lt;0.001</b>	-0.378 (-0.863-0.107)	0.13
Peak force (N)	0.287 (-0.214-0.789)	0.26	0.339 (-0.154-0.832)	0.18	0.460 (-0.005-0.925)	0.052	-0.339 (-0.832-0.153)	0.18
Peak velocity [m/s]	0.518 (0.070-0.970)	<b>0.024</b>	0.534 (0.092-0.980)	<b>0.018</b>	0.673 (0.286-1.060)	<b>&lt;0.001</b>	-0.421 (-0.896-0.054)	0.083
Peak power (W)	0.538 (0.096-0.980)	<b>0.017</b>	0.536 (0.094-0.980)	<b>0.018</b>	0.766 (0.430-1.103)	<b>&lt;0.001</b>	-0.393 (-0.875-0.089)	0.11
RSImod (m/s)	0.511 (0.060-0.960)	<b>0.026</b>	0.547 (0.108-0.990)	<b>0.015</b>	0.599 (0.179-1.018)	<b>0.005</b>	-0.302 (-0.802-0.197)	0.24
Peak force (N/kg)	0.153 (-0.365-0.670)	0.56	0.331 (-0.163-0.826)	0.19	0.108 (-0.413-0.628)	0.69	-0.339 (-0.832-0.154)	0.18
Peak power (W/kg)	0.681 (0.298-1.065)	<b>&lt;0.001</b>	0.716 (0.350-1.081)	<b>&lt;0.001</b>	0.784 (0.459-1.109)	<b>&lt;0.001</b>	-0.477 (-0.938-0.017)	<b>0.042</b>
Peak propulsive force/kg (N/kg)	0.183 (-0.331-0.698)	0.48	0.372 (-0.115-0.858)	0.13	0.119 (-0.401-0.639)	0.65	-0.353 (-0.843-0.137)	0.16
AVG propulsive force/kg (N/kg)	0.616 (0.203-1.029)	<b>0.003</b>	0.716 (0.350-1.082)	<b>&lt;0.001</b>	0.530 (0.086-0.970)	<b>0.019</b>	-0.376 (-0.862-0.109)	0.13
Peak propulsive power/kg (W/kg)	0.686 (0.305-1.067)	<b>&lt;0.001</b>	0.725 (0.364-1.086)	<b>&lt;0.001</b>	0.776 (0.446-1.106)	<b>&lt;0.001</b>	-0.482 (-0.941-0.023)	<b>0.040</b>
AVG propulsive power/kg (W/kg)	0.631 (0.225-1.038)	<b>0.002</b>	0.719 (0.356-1.083)	<b>&lt;0.001</b>	0.703 (0.331-1.076)	<b>&lt;0.001</b>	-0.469 (-0.932-0.007)	<b>0.047</b>

Statistically significant variables were adjusted for age, body mass, and body fat;  $\beta$ , unstandardized coefficient; 95%CI, confidence interval; VDBP, vitamin D binding protein; VO<sub>2max</sub>, maximal oxygen uptake; L, left; R, right; CMJ, countermovement vertical jump; AVG, average. Bold values are statistically significant.

**TABLE 3 |** Association of athletic performance with vitamin D metabolites by multiple regression analyses\* in outdoor players ( $n = 24$ ).

Physical fitness test variables	Total 25-(OH)D [ng/mL]		24,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> [ng/mL]		3-epi-25-(OH)D <sub>3</sub> [ng/mL]		1,25(OH) <sub>2</sub> D [pg/mL]	
	$\beta$ (95% CI)	$p$ -value	$\beta$ (95% CI)	$p$ -value	$\beta$ (95% CI)	$p$ -value	$\beta$ (95% CI)	$p$ -value
VO <sub>2max</sub> (ml/kg/min)	0.095 (-0.321-0.511)	0.66	0.232 (-0.174-0.638)	0.26	0.090 (-0.326-0.507)	0.67	-0.112 (-0.527-0.303)	0.60
Handgrip strength L (kg)	-0.049 (-0.466-0.369)	0.82	-0.062 (-0.479-0.355)	0.77	0.061 (-0.356-0.478)	0.78	-0.152 (-0.565-0.261)	0.47
Handgrip strength R (kg)	0.079 (-0.337-0.496)	0.71	0.113 (-0.302-0.528)	0.59	0.117 (-0.298-0.532)	0.58	-0.041 (-0.459-0.376)	0.85
Jump height (cm)	0.314 (-0.124-0.753)	0.16	0.265 (-0.180-0.711)	0.24	0.359 (-0.072-0.790)	0.10	-0.077 (-0.538-0.383)	0.74
Peak force (N)	0.339 (-0.096-0.774)	0.13	0.303 (-0.137-0.744)	0.18	0.444 (0.030-0.858)	<b>0.035</b>	-0.140 (-0.597-0.318)	0.55
Peak velocity (m/s)	0.276 (-0.168-0.720)	0.22	0.219 (-0.232-0.669)	0.34	0.331 (-0.105-0.767)	0.14	-0.087 (-0.548-0.373)	0.71
Peak power (W)	0.432 (0.015-0.848)	<b>0.042</b>	0.312 (-0.127-0.751)	0.16	0.492 (0.089-0.894)	<b>0.017</b>	-0.321 (-0.758-0.117)	0.15
RSImod (m/s)	0.264 (-0.182-0.709)	0.25	0.308 (-0.132-0.747)	0.17	0.229 (-0.221-0.678)	0.32	-0.058 (-0.519-0.403)	0.80
Peak force (N/kg)	0.118 (-0.341-0.577)	0.61	0.188 (-0.266-0.641)	0.42	0.311 (-0.128-0.750)	0.16	0.128 (-0.330-0.586)	0.58
Peak power (W/kg)	0.261 (-0.185-0.707)	0.25	0.203 (-0.250-0.655)	0.38	0.384 (-0.042-0.811)	0.08	-0.130 (-0.588-0.328)	0.58
Peak propulsive force/kg (N/kg)	0.127 (-0.331-0.585)	0.59	0.191 (-0.263-0.644)	0.41	0.323 (-0.115-0.760)	0.15	0.119 (-0.340-0.578)	0.61
AVG propulsive force/kg (N/kg)	0.337 (-0.098-0.772)	0.13	0.311 (-0.128-0.750)	0.17	0.475 (0.068-0.881)	<b>0.022</b>	-0.042 (-0.503-0.420)	0.86
Peak propulsive power/kg (W/kg)	0.274 (-0.170-0.718)	0.23	0.214 (-0.237-0.665)	0.35	0.395 (-0.030-0.819)	0.07	-0.142 (-0.599-0.316)	0.54
AVG propulsive power/kg (W/kg)	0.316 (-0.122-0.754)	0.16	0.260 (-0.186-0.706)	0.25	0.432 (0.016-0.849)	<b>0.042</b>	-0.029 (-0.491-0.433)	0.90

Statistically significant variables were adjusted for age, body mass, and body fat;  $\beta$ , unstandardized coefficient; 95% CI, confidence interval; VDBP, vitamin D binding protein; VO<sub>2max</sub>, maximal oxygen uptake; L, left; R, right; CMJ, countermovement vertical jump; AVG, average. Bold values are statistically significant.

**TABLE 4** | Association of athletic performance with VDBP, free, and bioavailable 25-(OH)D concentration by multiple regression analyses\* in indoor players ( $n = 16$ ).

Physical fitness test variables	VDBP [μmol/L]		Free 25-(OH)D M1 [pg/mL]		Free 25-(OH)D M2 [pg/mL]		Bioavailable 25-(OH)D [ng/mL]	
	β (95% CI)	p-value	β (95% CI)	p-value	β (95% CI)	p-value	β (95% CI)	p-value
VO <sub>2max</sub> (ml/kg/min)	0.144 (-0.502--0.791)	0.66	0.066 (-0.585--0.718)	0.84	0.066 (-0.586--0.718)	0.84	0.093 (-0.557--0.744)	0.78
Handgrip strength L (kg)	0.066 (-0.457--0.589)	0.80	0.456 (-0.010--0.922)	<b>0.05</b>	0.459 (-0.007--0.924)	<b>0.05</b>	0.427 (-0.047--0.901)	0.077
Handgrip strength R (kg)	0.154 (-0.363--0.672)	0.56	0.425 (-0.050--0.899)	0.079	0.429 (-0.044--0.903)	0.075	0.404 (-0.075--0.883)	0.10
Jump height (cm)	-0.259 (-0.765--0.247)	0.32	0.668 (0.278--1.058)	<b>&lt;0.001</b>	0.670 (0.280--1.059)	<b>&lt;0.001</b>	0.635 (0.230--1.039)	<b>0.002</b>
Peak force (N)	0.274 (-0.230--0.778)	0.29	0.227 (-0.283--0.737)	0.38	0.235 (-0.274--0.744)	0.37	0.179 (-0.336--0.695)	0.50
Peak velocity (m/s)	-0.230 (-0.740--0.280)	0.38	0.633 (0.227--1.038)	<b>0.002</b>	0.635 (0.230--1.040)	<b>0.002</b>	0.596 (0.176--1.017)	<b>0.005</b>
Peak power (W)	0.091 (-0.431--0.613)	0.73	0.562 (0.128--0.995)	<b>0.011</b>	0.568 (0.137--0.999)	<b>0.010</b>	0.524 (0.077--0.97)	<b>0.021</b>
RSImod (m/s)	-0.216 (-0.728--0.295)	0.41	0.580 (0.154--1.007)	<b>0.008</b>	0.581 (0.154--1.007)	<b>0.008</b>	0.552 (0.115--0.99)	<b>0.013</b>
Peak force (N/kg)	-0.021 (-0.545--0.503)	0.94	0.131 (-0.388--0.650)	0.62	0.133 (-0.386--0.653)	0.61	0.098 (-0.424--0.619)	0.71
Peak power (W/kg)	-0.183 (-0.698--0.332)	0.49	0.773 (0.440--1.105)	<b>&lt;0.001</b>	0.775 (0.444--1.106)	<b>&lt;0.001</b>	0.750 (0.403--1.096)	<b>&lt;0.001</b>
Peak propulsive force/kg (N/kg)	-0.018 (-0.541--0.506)	0.95	0.159 (-0.358--0.676)	0.55	0.162 (-0.355--0.679)	0.54	0.126 (-0.393--0.646)	0.63
AVG propulsive force/kg (N/kg)	-0.042 (-0.565--0.481)	0.88	0.612 (0.198--1.026)	<b>0.004</b>	0.614 (0.200--1.027)	<b>0.004</b>	0.602 (0.184--1.020)	<b>0.005</b>
Peak propulsive power/kg (W/kg)	-0.170 (-0.686--0.346)	0.52	0.773 (0.440--1.105)	<b>&lt;0.001</b>	0.775 (0.444--1.106)	<b>&lt;0.001</b>	0.751 (0.405--1.097)	<b>&lt;0.001</b>
AVG propulsive power/kg (W/kg)	-0.195 (-0.709--0.319)	0.46	0.713 (0.346--1.080)	<b>&lt;0.001</b>	0.716 (0.350--1.082)	<b>&lt;0.001</b>	0.683 (0.300--1.065)	<b>&lt;0.001</b>

\*Statistically significant variables were adjusted for age, body mass, and body fat; β, unstandardized coefficient; 95% CI, confidence interval; VDBP, vitamin D binding protein; VO<sub>2max</sub>, maximal oxygen uptake; L, left; R, right; CMJ, countermovement vertical jump; AVG, average; M1, equations by Bikle et al. (1986); M2, equations by Vermeulen et al. (1999). Bold values are statistically significant.

propulsive force, and power. There was also significant correlation between 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> and handgrip strength (L, R). Multiple regression analysis indicated that 1,25(OH)<sub>2</sub>D significantly associated with handgrip strength (R), peak power, and propulsive power.

There was significant correlation between free 25-(OH)D (M1, M2) and handgrip strength (L) in indoor players. Analysis showed that free 25-(OH)D (M1,M2) and bioavailable 25-(OH)D significantly associated with jump height, peak velocity, power, RSImod, propulsive force, and power (Table 4).

In the group of outdoor players, multiple regression analysis showed that peak power was significantly associated with serum total 25-(OH)D and 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>. The association between peak force, propulsive force and power, and 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> was observed (Table 3).

Table 5 presents the association of VDBP, free (M1, M2), and bioavailable 25-(OH)D with athletic performance by multiple regression analyses in outdoor players. According to our results,

there was no significant correlation between VDBP, free (M1, M2), bioavailable 25-(OH)D, and physical performance parameters in outdoor athletes.

## 4 DISCUSSION

This study represents a picture of the entire set of vitamin D metabolites in athletes. In this study, the enrolled athletes were classified into two groups, train indoor and outdoor. The aim of our study was to determine the relationship between metabolites of vitamin D, VDBP, free, bioavailable 25-(OH)D, related blood parameters (iPTH, Ca, and ACa), and physical fitness tests in athletes.

Physical activity can affect vitamin D metabolism and, hence, the final level of 25-(OH)D, main indicator of vitamin D status, and the other metabolites, all having important physiological roles. Further, it is possible that vitamin D metabolism is

**TABLE 5** | Association of athletic performance with VDBP, free, and bioavailable 25-(OH)D concentration by multiple regression analyses\* in outdoor players ( $n = 24$ ).

Physical fitness test variables	VDBP [μmol/L]		Free 25-(OH)D M1 [pg/mL]		Free 25-(OH)D M2 [pg/mL]		Bioavailable 25-(OH)D [ng/mL]	
	β (95% CI)	p-value	β (95% CI)	p-value	β (95% CI)	p-value	β (95% CI)	p-value
VO <sub>2max</sub> (ml/kg/min)	-0.141 (-0.565—0.282)	0.51	0.073 (-0.353—0.500)	0.74	0.072 (-0.354—0.499)	0.74	0.069 (-0.358—0.496)	0.75
Handgrip strength L (kg)	-0.282 (-0.692—0.129)	0.18	0.135 (-0.289—0.559)	0.53	0.131 (-0.293—0.555)	0.54	0.141 (-0.283—0.564)	0.51
Handgrip strength R (kg)	0.021 (-0.407—0.448)	0.92	0.079 (-0.348—0.505)	0.72	0.079 (-0.348—0.505)	0.72	0.096 (-0.330—0.521)	0.66
Jump height (cm)	0.160 (-0.309—0.629)	0.50	0.201 (-0.265—0.666)	0.40	0.203 (-0.263—0.668)	0.39	0.185 (-0.282—0.652)	0.44
Peak force (N)	-0.133 (-0.604—0.338)	0.58	0.289 (-0.166—0.744)	0.21	0.289 (-0.166—0.744)	0.21	0.246 (-0.214—0.707)	0.29
Peak velocity (m/s)	0.158 (-0.311—0.628)	0.51	0.186 (-0.281—0.653)	0.44	0.187 (-0.280—0.654)	0.43	0.171 (-0.298—0.639)	0.48
Peak power (W)	-0.064 (-0.539—0.410)	0.79	0.356 (-0.089—0.800)	0.12	0.356 (-0.089—0.800)	0.12	0.319 (-0.132—0.769)	0.17
RSImod (m/s)	-0.038 (-0.513—0.437)	0.88	0.232 (-0.231—0.694)	0.33	0.233 (-0.229—0.695)	0.32	0.238 (-0.224—0.700)	0.31
Peak force (N/kg)	-0.016 (-0.492—0.459)	0.95	0.089 (-0.385—0.562)	0.71	0.090 (-0.383—0.564)	0.71	0.088 (-0.386—0.561)	0.72
Peak power (W/kg)	0.021 (-0.455—0.496)	0.93	0.222 (-0.241—0.686)	0.35	0.223 (-0.240—0.686)	0.35	0.217 (-0.247—0.681)	0.36
Peak propulsive force/kg [N/kg]	-0.040 (-0.515—0.435)	0.87	0.106 (-0.367—0.578)	0.66	0.107 (-0.365—0.580)	0.66	0.104 (-0.369—0.577)	0.67
AVG propulsive force/kg [N/kg]	-0.087 (-0.561—0.386)	0.72	0.298 (-0.155—0.752)	0.20	0.299 (-0.154—0.753)	0.20	0.303 (-0.150—0.756)	0.19
Peak propulsive power/kg (W/kg)	-0.141 (-0.565—0.282)	0.96	0.235 (-0.227—0.697)	0.32	0.236 (-0.226—0.698)	0.32	0.231 (-0.231—0.694)	0.33
AVG propulsive power/kg (W/kg)	-0.282 (-0.692—0.129)	0.82	0.231 (-0.232—0.693)	0.33	0.233 (-0.230—0.695)	0.32	0.224 (-0.239—0.687)	0.34

Statistically significant variables were adjusted for age, body mass, and body fat; β, unstandardized coefficient; 95% CI, confidence interval; VDBP, vitamin D binding protein; VO<sub>2max</sub>, maximal oxygen uptake; L, left; R, right; CMJ, countermovement vertical jump; AVG, average; M1, equations by Bikle et al. (1986); M2, equations by Vermeulen et al. (1999).

differently affected by different kinds of physical activity (in terms of muscle action and sun exposure). Thereby, it is interesting to compare these two situations.

Skeletal muscles express, other than the VDR, CYP27B1 (the gene encoding for 1α-hydroxylase, the enzyme that hydroxylates 25-(OH)D into 1,25-(OH)<sub>2</sub>D. Therefore, skeletal muscles are able to activate vitamin D (Latham et al., 2021). Although the biological relevance of the expression of this enzymatic activity is not well defined, it has been hypothesized that it is related to mitochondrial function and muscle regeneration, at least in rodents (Latham et al., 2021). Further, 1α-hydroxylase expression is decreased in denervation, in rats (Mori et al., 2020), while it is increased in muscle biopsies from amyotrophic lateral sclerosis patients (Si et al., 2020). Therefore, although the unclear mechanisms underlying its regulation, evidences suggest a direct connection between the muscle activity and vitamin D metabolism.

We showed that in the group of indoor judoists there was a significant correlation between total 25-(OH)D and vertical jump

parameters (jump height, peak velocity, peak power, RSImod, and propulsive force and power). The relationship between total 25-(OH)D and physical performance levels of male athletes has been described in several studies (Fitzgerald et al., 2015; Kim et al., 2020; Most et al., 2021). Our study also showed the relationship between 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>, 1,25-(OH)<sub>2</sub>D, and vertical jump variables in indoor players. A small number of studies have assessed correlations between serum concentrations of 1,25-(OH)<sub>2</sub>D. Other vitamin D metabolites such as 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> have not been previously studied in relation to physical performance in athletes. Hassan-Smith et al. (2017) observed a statistically significant association between 1,25-(OH)<sub>2</sub>D and jump height-peak power in a group of 116 healthy human volunteers (79 women and 37 men; aged 20 ± 74 years). The authors demonstrated that 25-(OH)D<sub>3</sub> and 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> were associated with efficiency (a measure of the relationship between maximum jump force and power, with the less force required to generate the same power, the more efficient the jump) in the studied group (Hassan-Smith et al., 2017). 24,25-

(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> is not considered to be physiologically active although studies involving animal models demonstrated that it plays an important role in normal bone integrity, function, and healing (Seo et al., 1997; Nemere et al., 2006).

We showed that in the group of outdoor players there was a significant association between serum total 25-(OH)D and peak power. Other studies demonstrated a positive association between 25-(OH)D levels and jump height in male soccer players (Koundourakis et al., 2014) and university-level outdoor athletes (Wilson-Barnes et al., 2020). We also showed the association between 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> and peak power, force, propulsive force, and power in outdoor athletes. Mieszkowski et al. (2020) demonstrated that serum 25-(OH)D<sub>3</sub>, 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, and 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> levels significantly increased after the ultra-marathon in control and supplemented group. C-3 epimerization is a common metabolic pathway of major metabolites of vitamin D<sub>3</sub>. 25-(OH)D<sub>3</sub> undergoes epimerization, and 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> is the most prevalent form (Singh et al., 2006). The biological function of 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> is not well understood. To the best of our knowledge, this is the first paper reporting relationship between physical performance indicators and 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> levels in athletes. Therefore, it is pivotal to study the effects of vitamin D metabolites' action on skeletal muscle function in relation to athletic performance.

The free hormone hypothesis postulates that only the non-bound fraction (the free fraction) of hormones, which otherwise circulate in blood bound to their carrier proteins, is able to enter the cells and to exert their biologic effects (Bikle and Schwartz, 2019). Studies suggest that some functions of vitamin D may be more closely related to the free or bioavailable fraction of vitamin D than to total serum 25-(OH)D concentrations (Bikle et al., 2017; Owens et al., 2018).

Therefore, we considered whether the free fraction of 25-(OH)D correlates with musculoskeletal functions in relation to physical performance in athletes. To the best of our knowledge, there are no studies designed to assess VDBP, free, and bioavailable vitamin D status in athletes and its correlation to athletic performance. The impact of vitamin D on muscle strength, especially lower muscle strength in athletes, was evident in most studies (Hamilton et al., 2014; Koundourakis et al., 2014; Książek et al., 2016; Książek et al., 2018) and was physiologically explained by different vitamin D receptor expressions in various muscle groups (Bischoff et al., 2001; Hassan-Smith et al., 2017). Vitamin D affects the number and diameter of type II muscle fibers, which mainly regulate the ability to perform short high-power exercises (Dzik and Kaczor, 2019). Therefore, we used a vertical jump to check athletic performance in studied groups. A vertical jump is one of the essential motor skills that requires complex motor coordination, and it has been identified as one of the fundamental movement skills. Therefore, vertical jump test is used to evaluate simple lower limb muscular strength and complex tasks, such as sprint deceleration, sprint acceleration, throwing, and change of direction (Petrigna et al., 2019), which reflect physical effort during judo and football match.

We demonstrated associations between free and bioavailable 25-(OH)D levels and aspects of physical performance (handgrip strength L, vertical jump variables); this was, however, only observed within the indoor group. The differences in the obtained result between indoor and outdoor athletes may be due to the baseline individual training profile, different kinds of physical effort related to sport discipline, and hence activation of different muscle groups. This might explain the lack of significant association between VDBP, free, bioavailable 25-(OH)D, and physical performance variables in our outdoor players.

As a homeostatic perturbation, exercise and training affects calcium metabolism. Thereby, the measurement of PTH and calcium is relevant to assess the athlete's health status as well as to contextualize the change observed in vitamin D metabolites (Lombardi et al., 2020). The results of our study showed that iPTH, Ca, and ACa were associated with and vitamin D metabolites, VDBP, free and bioavailable 25-(OH)D in both groups. However, we did not find differences in these associations between indoor and outdoor athletes. However, studies in this field are limited. In a recent study conducted at the British university athletes, we compared the seasonal effects (fall vs spring) of discipline, specific training, either indoors or outdoors on bone indices, and vitamin D status. Seasonal variation of serum 25-(OH)D was found independent from training modality (indoor vs outdoor) and PTH resulted negatively associated with the vitamin D status in the combined groups, indoor group, and more significant in the outdoor group during the spring term (Wilson-Barnes et al., 2020). In military recruits, a 32-week training program reduced vitamin D status (25-(OH)D < 50 nmol/L) and enhanced concentrations of PTH associated with the occurrence of stress fractures (Davey et al., 2016). Similarly to our study, instead, PTH resulted unaffected by an 8-week repeated sprint training regimen in young active men (Sansoni et al., 2018) and by 13 weeks of military training (O'Leary et al., 2019), despite the changes in bone indexes.

#### 4.1 Limitations and Strengths of the Study

Some limitations should be considered when evaluating the result of this analysis: first, the limited sample size, so further research on a larger group of athletes is needed, and second, there was a lack of a non-sportive control group. Furthermore, our data are associational and no causal links between the vitamin D metabolites and physical performance can be drawn from this study. A notable strength of our investigation is, instead, the homogeneity within each cohort of experienced male athletes sharing the same age and anthropometry. We performed blood drawing and physical performance test in the same period (within two weeks) for both cohorts and strong pre-analytical phase.

## 5 CONCLUSION

Our study showed a significant correlation between vitamin D metabolites [total 25-(OH)D, 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>,

and 1,25-(OH)<sub>2</sub>D] and handgrip strength and vertical jump variables in indoor players. It also showed a significant association between 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> and vertical jump parameters in outdoor players. The results of our study demonstrated the relationship between free, bioavailable 25-(OH)D, and vertical jump variables only in the group of indoor players.

In conclusion, this is the first study demonstrating the relationship between vitamin D metabolites, free and bioavailable 25-(OH)D, and physical performance in athletes. These observations imply that vitamin D metabolites might be involved in skeletal muscle function. However, more work is needed to explore the role of vitamin D metabolites in relation to athletic performance.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusion of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

## ETHICS STATEMENT

The study was approved by the Bioethics Committee of the University School of Physical Education, Wrocław, Poland (resolution number 18/2013). Informed consent was obtained from all participants included in the study. All related procedures

were conducted in compliance with the standard of ethics outlined in the Declaration of Helsinki (Harriss et al., 2019).

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

AK participated in the conception and design of the study, contributed to the investigation, data curation, analysis, and interpretation of data for the work, and prepared the original draft. AZ participated in the conception and design of the study and contributed to the investigation and data curation. MS-L participated in the design of the study and reviewed the manuscript. GL participated in the conception and design of the study, contributed to the interpretation of results, and reviewed and edited the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## FUNDING

This research was supported financially by the University School of Physical Education, Wrocław.

## ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge all the athletes for their interest and participation in this study.

## REFERENCES

- Antinozzi, C., Corinaldesi, C., Giordano, C., Pisano, A., Cerbelli, B., Migliaccio, S., et al. (2017). Potential Role for the VDR Agonist Elocalcitol in Metabolic Control: Evidences in Human Skeletal Muscle Cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 167, 169–181. doi:10.1016/j.jsbmb.2016.12.010
- Ashcroft, S. P., Bass, J. J., Kazi, A. A., Atherton, P. J., and Philp, A. (2020). The Vitamin D Receptor Regulates Mitochondrial Function in C2C12 Myoblasts. *Am. J. Physiology-Cell Physiology* 318 (3), C536–c541. doi:10.1152/ajpcell.00568.2019
- Bikle, D. D., Gee, E., Halloran, B., Kowalski, M. A., Ryzen, E., and Haddad, J. G. (1986). Assessment of the Free Fraction of 25-Hydroxyvitamin D in Serum and its Regulation by Albumin and the Vitamin D-Binding Protein \*. *J. Clin. Endocrinol. Metabolism* 63 (4), 954–959. doi:10.1210/jcem-63-4-954
- Bikle, D. D., Malmstroem, S., and Schwartz, J. (2017). Current Controversies. *Endocrinol. Metabolism Clin. N. Am.* 46 (4), 901–918. doi:10.1016/j.ecl.2017.07.013
- Bikle, D. D., and Schwartz, J. (2019). Vitamin D Binding Protein, Total and Free Vitamin D Levels in Different Physiological and Pathophysiological Conditions. *Front. Endocrinol.* 10, 317. doi:10.3389/fendo.2019.00317
- Bischoff, H. A., Borchers, M., Gudat, F., Duermueller, U., Theiler, R., Stähelin, H. B., et al. (2001). *In Situ* detection of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> Receptor in Human Skeletal Muscle Tissue. *Histochem J.* 33 (1), 19–24. doi:10.1023/a:1017535728844
- Brown, A. J., Ritter, C. S., Weiskopf, A. S., Vouros, P., Sasso, G. J., Uskokovic, M. R., et al. (2005). Isolation and Identification of 1 $\alpha$ -Hydroxy-3-Epi-Vitamin D<sub>3</sub>, a Potent Suppressor of Parathyroid Hormone Secretion. *J. Cell. Biochem.* 96 (3), 569–578. doi:10.1002/jcb.20553
- Buchheit, M. (2008). The 30-15 Intermittent Fitness Test: Accuracy for Individualizing Interval Training of Young Intermittent Sport Players. *J. Strength Cond. Res.* 22 (2), 365–374. doi:10.1519/JSC.0b013e3181635b2e
- Chun, R. F., Peercy, B. E., Orwoll, E. S., Nielson, C. M., Adams, J. S., and Hewison, M. (2014). Vitamin D and DBP: the Free Hormone Hypothesis Revisited. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 144, 132–137. doi:10.1016/j.jsbmb.2013.09.012
- Davey, T., Lanham-New, S. A., Shaw, A. M., Hale, B., Cobley, R., Berry, J. L., et al. (2016). Low Serum 25-hydroxyvitamin D Is Associated with Increased Risk of Stress Fracture during Royal Marine Recruit Training. *Osteoporos. Int.* 27 (1), 171–179. doi:10.1007/s00198-015-3228-5
- Di Luigi, L., Antinozzi, C., Piantanida, E., and Sgrò, P. (2020). Vitamin D, Sport and Health: a Still Unresolved Clinical Issue. *J. Endocrinol. Invest.* 43 (12), 1689–1702. doi:10.1007/s40618-020-01347-w
- Dzik, K. P., and Kaczor, J. J. (2019). Mechanisms of Vitamin D on Skeletal Muscle Function: Oxidative Stress, Energy Metabolism and Anabolic State. *Eur. J. Appl. Physiol.* 119 (4), 825–839. doi:10.1007/s00421-019-04104-x
- Farrokhlyar, F., Tabasinejad, R., Dao, D., Peterson, D., Ayeni, O. R., Hadioonzadeh, R., et al. (2015). Prevalence of Vitamin D Inadequacy in Athletes: a Systematic-Review and Meta-Analysis. *Sports Med.* 45 (3), 365–378. doi:10.1007/s40279-014-0267-6
- Fitzgerald, J. S., Peterson, B. J., Warpeha, J. M., Johnson, S. C., and Ingraham, S. J. (2015). Association between Vitamin D Status and Maximal-Intensity Exercise Performance in Junior and Collegiate Hockey Players. *J. Strength Cond. Res.* 29 (9), 2513–2521. doi:10.1519/jsc.0000000000000887
- Garcia, L. A., King, K. K., Ferrini, M. G., Norris, K. C., and Artaza, J. N. (2011). 1,25(OH)<sub>2</sub>vitamin D<sub>3</sub> Stimulates Myogenic Differentiation by Inhibiting Cell Proliferation and Modulating the Expression of Proliferative Growth Factors and Myostatin in C2C12 Skeletal Muscle Cells. *Endocrinology* 152 (8), 2976–2986. doi:10.1210/en.2011-0159
- Girgis, C. M., Clifton-Bligh, R. J., Hamrick, M. W., Holick, M. F., and Gunton, J. E. (2013). The Roles of Vitamin D in Skeletal Muscle: Form, Function, and Metabolism. *Endocr. Rev.* 34 (1), 33–83. doi:10.1210/er.2012-1012
- Halfon, M., Phan, O., and Teta, D. (2015). Vitamin D: a Review on its Effects on Muscle Strength, the Risk of Fall, and Frailty. *BioMed Res. Int.* 2015, 953241. doi:10.1155/2015/953241

- Hamilton, B., Whiteley, R., Farooq, A., and Chalabi, H. (2014). Vitamin D Concentration in 342 Professional Football Players and Association with Lower Limb Isokinetic Function. *J. Sci. Med. Sport* 17 (1), 139–143. doi:10.1016/j.jsams.2013.03.006
- Harriss, D. J., MacSween, A., and Atkinson, G. (2019). Ethical Standards in Sport and Exercise Science Research: 2020 Update. *Int. J. Sports Med.* 40 (13), 813–817. doi:10.1055/a-1015-3123
- Hassan-Smith, Z. K., Jenkinson, C., Smith, D. J., Hernandez, I., Morgan, S. A., Crabtree, N. J., et al. (2017). 25-hydroxyvitamin D3 and 1,25-dihydroxyvitamin D3 Exert Distinct Effects on Human Skeletal Muscle Function and Gene Expression. *PLoS One* 12 (2), e0170665. doi:10.1371/journal.pone.0170665
- Herrmann, M., Farrell, C.-J. L., Pusccheddu, I., Fabregat-Cabello, N., and Cavalier, E. (2017). Assessment of Vitamin D Status - a Changing Landscape. *Clin. Chem. Lab. Med.* 55 (1), 3–26. doi:10.1515/cclm-2016-0264
- Kim, D. K., Park, G., Kuo, L.-T., and Park, W.-H. (2020). Association of Vitamin D Status with Lower Limb Muscle Strength in Professional Basketball Players: A Cross-Sectional Study. *Nutrients* 12 (9), 2715. doi:10.3390/nu12092715
- Koundourakis, N. E., Androulakis, N. E., Malliaraki, N., and Margioris, A. N. (2014). Vitamin D and Exercise Performance in Professional Soccer Players. *PLoS One* 9 (7), e101659. doi:10.1371/journal.pone.0101659
- Krzywanski, J., Mikulski, T., Krzysztofak, H., Mlynczak, M., Gaczynska, E., and Ziemba, A. (2016). Seasonal Vitamin D Status in Polish Elite Athletes in Relation to Sun Exposure and Oral Supplementation. *PLoS One* 11 (10), e0164395. doi:10.1371/journal.pone.0164395
- Książek, A., Dziubek, W., Pietraszewska, J., and Słowińska-Lisowska, M. (2018). Relationship between 25(OH)D Levels and Athletic Performance in Elite Polish Judoists. *bs* 35 (2), 191–196. doi:10.5114/biolisport.2018.74195
- Książek, A., Zagrodna, A., Dziubek, W., Pietraszewski, B., Ochmann, B., and Słowińska Lisowska, M. (2016). 25(OH)D3 Levels Relative to Muscle Strength and Maximum Oxygen Uptake in Athletes. *J. Hum. Kinet.* 50, 71–77. doi:10.1515/hukin-2015-0144
- Latham, C. M., Brightwell, C. R., Keeble, A. R., Munson, B. D., Thomas, N. T., Zagzoog, A. M., et al. (2021). Vitamin D Promotes Skeletal Muscle Regeneration and Mitochondrial Health. *Front. Physiol.* 12, 660498. doi:10.3389/fphys.2021.660498
- Lombardi, G., Vitale, J. A., Logoluso, S., Logoluso, G., Cocco, N., Cocco, G., et al. (2017). Circannual Rhythm of Plasmatic Vitamin D Levels and the Association with Markers of Psychophysical Stress in a Cohort of Italian Professional Soccer Players. *Chronobiology Int.* 34 (4), 471–479. doi:10.1080/07420528.2017.1297820
- Lombardi, G., Ziemann, E., Banfi, G., and Corbetta, S. (2020). Physical Activity-dependent Regulation of Parathyroid Hormone and Calcium-Phosphorus Metabolism. *Ijms* 21 (15), 5388. doi:10.3390/ijms21155388
- Lutsey, P. L., Eckfeldt, J. H., Ogagarue, E. R., Folsom, A. R., Michos, E. D., and Gross, M. (2015). The 25-hydroxyvitamin D3 C-3 Epimer: Distribution, Correlates, and Reclassification of 25-hydroxyvitamin D Status in the Population-Based Atherosclerosis Risk in Communities Study (ARIC). *Clin. Chim. Acta* 442, 75–81. doi:10.1016/j.cca.2014.12.036
- McMahon, J. J., Suchomel, T. J., Lake, J. P., and Comfort, P. (2018). Understanding the Key Phases of the Countermovement Jump Force-Time Curve. *Strength & Cond. J.* 40 (4), 96–106. doi:10.1519/ssc.0000000000000375
- Mieszkowski, J., Kochanowicz, A., Piskorska, E., Niespodziński, B., Siódmiak, J., Buško, K., et al. (2021). Serum Levels of Bone Formation and Resorption Markers in Relation to Vitamin D Status in Professional Gymnastics and Physically Active Men during Upper and Lower Body High-Intensity Exercise. *J. Int. Soc. Sports Nutr.* 18 (1), 29. doi:10.1186/s12970-021-00430-8
- Mieszkowski, J., Stankiewicz, B., Kochanowicz, A., Niespodziński, B., Kowalik, T., Żmijewski, M. A., et al. (2020). Ultra-Marathon-Induced Increase in Serum Levels of Vitamin D Metabolites: A Double-Blind Randomized Controlled Trial. *Nutrients* 12 (12), 3629. doi:10.3390/nu12123629
- Mori, R., Yokokawa, T., and Fujita, S. (2020). Modified Expression of Vitamin D Receptor and CYP27B1 in Denervation-Induced Muscle Atrophy. *Biochem. Biophysical Res. Commun.* 529 (3), 733–739. doi:10.1016/j.bbrc.2020.05.205
- Most, A., Dörr, O., Nef, H., Hamm, C., Bauer, T., and Bauer, P. (2021). Influence of 25-Hydroxy-Vitamin D Insufficiency on Maximal Aerobic Power in Elite Indoor Athletes: A Cross-Sectional Study. *Sports Med. Open* 7 (1), 74. doi:10.1186/s40798-021-00363-1
- Nemere, I., Wilson, C., Jensen, W., Steinbeck, M., Rohe, B., and Farach-Carson, M. C. (2006). Mechanism of 24,25-dihydroxyvitamin D3-Mediated Inhibition of Rapid, 1,25-dihydroxyvitamin D3-Induced Responses: Role of Reactive Oxygen Species. *J. Cell. Biochem.* 99 (6), 1572–1581. doi:10.1002/jcb.21008
- O'Leary, T. J., Izard, R. M., Walsh, N. P., Tang, J. C. Y., Fraser, W. D., and Greeves, J. P. (2019). Skeletal Macro- and Microstructure Adaptations in Men Undergoing Arduous Military Training. *Bone* 125, 54–60. doi:10.1016/j.bone.2019.05.009
- Owen, N. J., Watkins, J., Kilduff, L. P., Bevan, H. R., and Bennett, M. A. (2014). Development of a Criterion Method to Determine Peak Mechanical Power Output in a Countermovement Jump. *J. Strength Cond. Res.* 28 (6), 1552–1558. doi:10.1519/jsc.0000000000000311
- Owens, D. J., Allison, R., and Close, G. L. (2018). Vitamin D and the Athlete: Current Perspectives and New Challenges. *Sports Med.* 48 (Suppl. 1), 3–16. doi:10.1007/s40279-017-0841-9
- Petrigna, L., Karsten, B., Marcolin, G., Paoli, A., D'Antona, G., Palma, A., et al. (2019). A Review of Countermovement and Squat Jump Testing Methods in the Context of Public Health Examination in Adolescence: Reliability and Feasibility of Current Testing Procedures. *Front. Physiol.* 10, 1384. doi:10.3389/fphys.2019.01384
- Pludowski, P., Holick, M. F., Grant, W. B., Konstantynowicz, J., Mascarenhas, M. R., Haq, A., et al. (2018). Vitamin D Supplementation Guidelines. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 175, 125–135. doi:10.1016/j.jsbmb.2017.01.021
- Powe, C. E., Ricciardi, C., Berg, A. H., Erdenesanaa, D., Collerone, G., Ankers, E., et al. (2011). Vitamin D-Binding Protein Modifies the Vitamin D-Bone Mineral Density Relationship. *J. Bone Min. Res.* 26 (7), 1609–1616. doi:10.1002/jbmr.387
- Rola, R., Kowalski, K., Bieńkowski, T., and Studzińska, S. (2020). Improved Sample Preparation Method for Fast LC-MS/MS Analysis of Vitamin D Metabolites in Serum. *J. Pharm. Biomed. Analysis* 190, 113529. doi:10.1016/j.jpba.2020.113529
- Sansoni, V., Perego, S., Vernillo, G., Barbuti, A., Merati, G., La Torre, A., et al. (2018). Effects of Repeated Sprints Training on Fracture Risk-Associated miRNA. *Oncotarget* 9 (26), 18029–18040. doi:10.18632/oncotarget.24707
- Seo, E.-G., Einhorn, T. A., and Norman, A. W. (1997). 24R,25-Dihydroxyvitamin D3: An Essential Vitamin D3 Metabolite for Both Normal Bone Integrity and Healing of Tibial Fracture in Chicks\*. *Endocrinology* 138 (9), 3864–3872. doi:10.1210/endo.138.9.5398
- Seo, E.-G., and Norman, A. W. (1997). Three-fold Induction of Renal 25-hydroxyvitamin D3-24-Hydroxylase Activity and Increased Serum 24,25-dihydroxyvitamin D3 Levels Are Correlated with the Healing Process after Chick Tibial Fracture. *J. Bone Min. Res.* 12 (4), 598–606. doi:10.1359/jbmr.1997.12.4.598
- Seo, M.-W., Song, J. K., Jung, H. C., Kim, S.-W., Kim, J.-H., and Lee, J.-M. (2019). The Associations of Vitamin D Status with Athletic Performance and Blood-Borne Markers in Adolescent Athletes: A Cross-Sectional Study. *Ijeph* 16 (18), 3422. doi:10.3390/ijeph16183422
- Shieh, A., Chun, R. F., Ma, C., Witzel, S., Meyer, B., Rafison, B., et al. (2016). Effects of High-Dose Vitamin D2 versus D3 on Total and Free 25-Hydroxyvitamin D and Markers of Calcium Balance. *J. Clin. Endocrinol. Metabolism* 101 (8), 3070–3078. doi:10.1210/jc.2016-1871
- Si, Y., Kazamel, M., Kwon, Y., Lee, I., Anderson, T., Zhou, S., et al. (2020). The Vitamin D Activator CYP27B1 Is Upregulated in Muscle Fibers in Denervating Disease and Can Track Progression in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 200, 105650. doi:10.1016/j.jsbmb.2020.105650
- Singh, R. J., Taylor, R. L., Reddy, G. S., and Grebe, S. K. G. (2006). C-3 Epimers Can Account for a Significant Proportion of Total Circulating 25-hydroxyvitamin D in Infants, Complicating Accurate Measurement and Interpretation of Vitamin D Status. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91 (8), 3055–3061. doi:10.1210/jc.2006-0710
- Siri, W. E. (1993). Body Composition from Fluid Spaces and Density: Analysis of Methods 1961. *Nutrition* 9 (5), 480–492.
- Tsuprykov, O., Chen, X., Hoher, C.-F., Skoblo, R., Lianghong, Y., and Hoher, B. (2018). Why Should We Measure Free 25(OH) Vitamin D? *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 180, 87–104. doi:10.1016/j.jsbmb.2017.11.014
- Valtueña, J., Dominguez, D., Til, L., González-Gross, M., and Drobic, F. (2014). The High Prevalence of Vitamin D Insufficiency Among Elite Spanish Athletes the Importance of Outdoor Training Adaptation. *Nutr. Hosp.* 30 (1), 124–131. doi:10.3305/nh.2014.30.1.7539

- Vermeulen, A., Verdonck, L., and Kaufman, J. M. (1999). A Critical Evaluation of Simple Methods for the Estimation of Free Testosterone in Serum. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84 (10), 3666–3672. doi:10.1210/jcem.84.10.6079
- Wilson-Barnes, S. L., Hunt, J. E. A., Mendis, J., Williams, E. L., King, D., Roberts, H., et al. (2021). The Relationship between Vitamin D Status, Intake and Exercise Performance in UK University-Level Athletes and Healthy Inactive Controls. *PLoS One* 16 (4), e0249671. doi:10.1371/journal.pone.0249671
- Wilson-Barnes, S. L., Hunt, J. E. A., Williams, E. L., Allison, S. J., Wild, J. J., Wainwright, J., et al. (2020). Seasonal Variation in Vitamin D Status, Bone Health and Athletic Performance in Competitive University Student Athletes: a Longitudinal Study. *J. Nutr. Sci.* 9, e8. doi:10.1017/jns.2020.1
- Withers, R. T., Craig, N. P., Bourdon, P. C., and Norton, K. I. (1987). Relative Body Fat and Anthropometric Prediction of Body Density of Male Athletes. *Eur. J. Appl. Physiol.* 56 (2), 191–200. doi:10.1007/bf00640643

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

**Publisher's Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Książek, Zagrodna, Słowińska-Lisowska and Lombardi. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



# Metabolism of vitamin D is not affected by sport activity

Anna Książek<sup>a,\*</sup>, Aleksandra Zagrodna<sup>a</sup>, Giovanni Lombardi<sup>b,c</sup>, Małgorzata Słowińska-Lisowska<sup>a</sup>



PODPIS ZAUFANY

ANNA  
KSIĄŻEK

14.12.2023 18:28:14 [GMT+1]

Dokument podpisany elektronicznie  
podpisem zaufanym

<sup>a</sup> Department of Biological and Medical Basis of Sport, Faculty of Physical Education and Sports, Wrocław University of Health and Sport Sciences, 35 Paderewskiego Avenue, 51-612 Wrocław, Poland

<sup>b</sup> Laboratory of Experimental Biochemistry & Molecular Biology, I.R.C.C.S. Istituto Ortopedico Galeazzi, Via Riccardo Galeazzi 4, 20161 Milan, Italy

<sup>c</sup> Department of Athletics, Strength and Conditioning, Poznań University of Physical Education, Królowej Jadwigi 27/39, 61-871 Poznań, Poland

## ARTICLE INFO

### Keywords:

24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>  
3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>  
Vitamin D metabolite ratio  
Free 25-(OH)D  
Athletes

## ABSTRACT

**Background:** Higher levels of physical activity are related to higher 25-(OH)D levels. Total 25-(OH)D (25-(OH)D<sub>T</sub>) are routinely used in clinical practice to assess vitamin D, however novel biomarkers are currently being investigated as free 25-(OH)D (25-(OH)D<sub>F</sub>) or vitamin D metabolite ratios (VMRs). The primary aim of our study was to assess 25-(OH)D<sub>F</sub>, vitamin D metabolites and VMRs in inactive men and athletes. A secondary aim was to check whether regular physical activity influence on vitamin D metabolome. A tertiary aim was to determine the relationship between 25-(OH)D<sub>T</sub>, 25-(OH)D<sub>F</sub>, vitamin D binding protein (VDBP), vitamin D metabolites and VMRs in this cohort.

**Methods:** A total of 69 participants (27 inactive men, 18 indoor and 24 outdoor athletes) participated in the study. Vitamin D metabolites (25-(OH)D<sub>T</sub>, 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>, and 1,25-(OH)<sub>2</sub>D) were assessed using LC-MS/MS. The 25-(OH)D<sub>F</sub> concentration was calculated based on serum albumin and VDBP levels.

**Results:** There were no differences in vitamin D metabolites and VMRs between inactive men and between the two groups of athletes. We showed a strong relationship between 25-(OH)D<sub>T</sub>, 25-(OH)D<sub>F</sub> and 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>, 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>:25-(OH)D<sub>3</sub> VMR in each group. Analysis showed that 25-(OH)D<sub>T</sub>, 25-(OH)D<sub>F</sub> inversely associated with 25-(OH)D<sub>3</sub>:24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 25-(OH)D<sub>3</sub>:3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>, 1,25-(OH)<sub>2</sub>D:24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ratios in inactive men and athletes (indoor and outdoor).

**Conclusions:** On the basis of our results, we concluded that regular long-term physical activity has no effect on the concentration of vitamin D metabolites at rest. Furthermore, free vitamin D does not correlate more strongly with vitamin D metabolites and VMRs compared to total.

## 1. Introduction

Vitamin D deficiency is a worldwide public health problem and represents an issue for populations with specific needs [1], including athletes [2,3]. Studies suggest higher rates of vitamin D deficiency in athletes occur especially at higher latitudes, in late autumn and winter, and in athletes who participate in indoor sports [2]. Due to presence of vitamin D receptors (VDRs) nearly in every nucleated cell, vitamin D deficiency may negatively affects on human health. It is well known, by now, that vitamin D plays important non-skeletal functions, such as those related to the cardiovascular system [4], immunity, inflammation [5], and skeletal muscle [6]. The most commonly used marker for the assessment of vitamin D status is total 25-hydroxyvitamin D (25-(OH)

D<sub>T</sub>) [7]. However, recent studies have suggested that 25-(OH)D<sub>F</sub> may be a poor marker of vitamin D sufficiency and may not be associated with important clinical outcomes, such as bone fracture and density [7,8]. Due to of common genetic variants in VDBP it might lead to different binding affinity of VDBP to 25-(OH)D. Therefore, bioavailability of 25-(OH)D varies between individuals, depending on VDBP phenotype and concentrations [9].

In general, the circulating pool of vitamin D includes three main metabolites: free, bioavailable and total 25-(OH)D. Of the overall circulating vitamin D, about 85–90% is bound to VDBP, about 10–15% is loosely bound to serum albumin, and only tiny amounts (<0.03%) exist in free, unbound form. The free form of 25-(OH)D is reported as 25-(OH)D<sub>F</sub>. The sum of albumin-bound and free vitamin D is defined as the

\* Corresponding author at: 35 Paderewskiego Avenue, 51-612 Wrocław, Poland.

E-mail addresses: [anna.ksiazek@awf.wroc.pl](mailto:anna.ksiazek@awf.wroc.pl) (A. Książek), [aleksandra.zagrodna@awf.wroc.pl](mailto:aleksandra.zagrodna@awf.wroc.pl) (A. Zagrodna), [giovanni.lombardi@grupposandonato.it](mailto:giovanni.lombardi@grupposandonato.it) (G. Lombardi), [malgorzata.slowinska-lisowska@awf.wroc.pl](mailto:malgorzata.slowinska-lisowska@awf.wroc.pl) (M. Słowińska-Lisowska).

<https://doi.org/10.1016/j.cca.2023.117507>

Received 15 May 2023; Received in revised form 11 July 2023; Accepted 4 August 2023

Available online 6 August 2023

0009-8981/© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.



bioavailable 25-(OH)D (25-(OH)D<sub>B</sub>). The sum of free, albumin bound and VDBPs bound fractions of vitamin D is referred to as the total 25-(OH)D (25-(OH)D<sub>T</sub>) [10]. The weakness of 25-(OH)D<sub>T</sub> as a marker of vitamin D status may be related to the different affinity of VDBPs for 25-(OH)D. Indeed, the actual bioavailability of 25-(OH)D can vary between individuals depending on VDBP polymorphisms in the encoding gene [11]. On the other hand, vitamin D biological activity may depend on its binding affinity with VDR and also on the consequent binding affinity to VDR-vitamin D complex to the transcriptional machinery within the cell nucleus. Therefore, VDR polymorphisms may account for the inter-individual differences in vitamin D biological activity [12]. Therefore, significant progress has been made in the analysis of vitamin D metabolites, and novel biomarkers of vitamin D status are currently being investigated, such as 25-(OH)D<sub>F</sub>, 25-(OH)D<sub>B</sub> or vitamin D metabolite ratios (VMRs) [13]. It is important to underline that, as it is emerging in different researches, VMR, and particularly 24,25-(OH)<sub>2</sub>D-to-25-(OH)D ratio (i.e., the ratio that indicate how much precursor could be converted into the bioactive form), may better represent the vitamin D status rather than 25-(OH)D only, since it takes into consideration the different metabolic fates. Specifically, the ratio 24,25-(OH)<sub>2</sub>D/25-(OH)D should range between 4% and 12%, a condition that reflect a correct vitamin D status regardless the absolute 25-(OH)D level [9].

Physical activity is a powerful stimulus for lipid mobilisation from adipose tissue, what may cause vitamin D release from adipocytes [14]. Recent studies have documented that higher levels of physical activity are related to higher levels of 25-(OH)D [15]. The effects of a single exercise on vitamin D metabolism are already well documented [15–17]. However, there are no such data on the effects of long-term, regular physical activity on the vitamin D metabolome. Therefore, the primary aim of our study was to assess 25-(OH)D<sub>F</sub>, vitamin D metabolites (24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>, 1,25-(OH)<sub>2</sub>D) and VMRs 25-(OH)D<sub>3</sub>:24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>; 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>:25-(OH)D<sub>3</sub>; 25-(OH)D<sub>3</sub>:3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>; 1,25-(OH)<sub>2</sub>D:24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) in inactive men and athletes. A secondary aim was to check whether regular physical activity influence on vitamin D metabolome. Moreover, we determined the relationship between metabolites of vitamin D (25-(OH)D<sub>T</sub>, 25-(OH)D<sub>F</sub>), VDBP and vitamin D metabolites, VMRs in this cohort.

## 2. Methods

### 2.1. Subjects

Inactive males and athletes from the Polish 2nd division (football team) and academic judo team were recruited to take part in this study. Inactive subjects were recruited using posters and brochures placed on social networks and communal areas; They were enrolled if they were 18–30 years old, with a BMI within the range 18–30 kg/m<sup>2</sup>, of Caucasian origin, not diagnosed with any of the chronic diseases, and did not exercise for more than 150 min/week. Athletes, instead, were included if the duration of their sport career was ≥ 7 years, training for > 10 h/week and competing at least at the national level. Potential participants were excluded if they used calcium and vitamin D, sunbeds or took part in a sunny vacation at least two months before the study. All participants were required to complete a health screening questionnaire to control for medical conditions/medication use. Finally, a total of 69 participants, 27 inactive men, and 42 athletes (including 18 judoists/indoor and 24 football players/outdoor) were included in this study. The study was carried out in Wrocław (Poland), which is situated at a latitude of 51°06'N, in two weeks in late February and early March 2021.

Participants provided their written informed consent prior to enrolment in the study. All related procedures were carried out in accordance with the standard of ethics outlined in the Declaration of Helsinki [18], and all procedures involving human subjects were approved by the Ethics Committee of the Wrocław University of Health and Sport Sciences (resolution number 18/2013).

### 2.2. Anthropometric measurements

As previously described [19] height (cm) and weight (kg) were measured using standardized procedures. Skinfold thickness was measured at seven sites (biceps, triceps, subscapular, suprailiac, abdominal, thigh, calf) with a Harpenden skinfold calliper characterized by a constant pressure of 10 g/mm<sup>2</sup> (British Indicators, Burgess Hill, UK). Each measurement was taken by the same person, 3 times per site and the mean value was used for calculation. The percentage of body fat was evaluated using the Withers et al. [20] and Siri et al. [21] formula.

### 2.3. Biochemical analyses

Participants were instructed to visit the laboratory between 7.00 and 8.00 a.m., after fasting and 24-hour abstinence from high-intensity physical activity. Blood samples were collected in plain tubes, containing a clot activator (Vacutest, Kima, Italy). Blood was kept at room temperature for 1 h and then centrifuged at 1300g, for 10 min, at 22 °C. The serum was aliquoted and stored at –80 °C until assayed.

As previously described [19] total calcium (Ca) was determined, in serum, by a colorimetric assay using the Konelab 60 system from bioMérieux (France). Albumin was assayed on a Siemens Dimension Xpand Plus clinical chemistry system (Siemens, Germany). Albumin-adjusted calcium (ACa) was calculated using the formula:

$$ACa(\text{mg/dL}) = Ca(\text{mg/dL}) + [(4 - \text{albumin}(\text{g/dL})) \times 0.8]$$

Intact parathyroid hormone (iPTH) in serum was determined by electrochemiluminescence assay (ECLIA) on an Elecsys analyser (Roche, Switzerland). The intra- and inter-assay coefficients of variation (CVs) were 4.5% and 4.8%, respectively, and the limit of detection was at 1.20 pg·mL<sup>-1</sup> (0.127 pmol·L<sup>-1</sup>).

### 2.4. Vitamin D metabolites levels

Liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS; QTRAP®4500 (Sciex) coupled with ExionLC HPLC system), with minor changes according to previously published method [22] was used to determine the circulating levels of the vitamin D metabolites (25-(OH)D<sub>3</sub>, 25-(OH)D<sub>2</sub> (25-(OH)D<sub>T</sub>), 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>, 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) and their ratios (25-(OH)D<sub>3</sub> to 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> to 25-(OH)D<sub>3</sub>, 25-(OH)D<sub>3</sub> to 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>, and 1,25-(OH)<sub>2</sub>D to 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>). The VMR was also calculated by dividing serum 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> by serum 25-(OH)D<sub>3</sub> and then multiplying by 100.

### 2.5. Free and bioavailable vitamin D via VDBP

The VDBP concentration was assayed by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). The intra-assay CV ranges between 5 and 7% and the inter-assay CV ranges between 5 and 8%.

We calculated free 25-(OH)D (25-(OH)D<sub>F</sub>) based on the formula by Bikle et al. [23] with the affinity binding constants for 25-(OH)D with albumin and VDBP (6 × 10<sup>5</sup>M<sup>-1</sup> and 7 × 10<sup>8</sup>M<sup>-1</sup>, respectively).

$$Free25 - (OH)D = \frac{total25 - (OH)D}{1 + (6 \times 10^5 \times albumin) + (7 \times 10^8 \times VDBP)}$$

The levels of bioavailable 25-(OH)D (25-(OH)D<sub>B</sub>) were calculated using equations adapted from those described by Powe et al. [11]

$$Bioavailable25 - (OH)D = (1 + (6 \times 10^5 \times albumin)) \times Free25 - (OH)D$$

### 2.6. Assessment of physical activity

The level of physical activity was evaluated using the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ) Short Form [24]. The intensity

of activity was defined as energy expenditure and was expressed in metabolic equivalents (METs): 1 MET is equivalent to the consumption of 3.5 ml of oxygen per minute per kg of body weight. Physical activity estimated with the IPAQ was finally expressed in MET-minutes/week, being the sum of the individual energy expenditures during high-, intermediate-, and low-intensity activities [25].

### 2.7. Statistical analysis

The sample size was estimated using the G power calculator 3.1.9.2 (<https://www.gpower.hhu.de/>). Comparison between inactive and athlete subgroups was performed using analysis of variance (ANOVA) with Games-Howell post-hoc comparison. To evaluate the differences between indoor and outdoor athletes, a Welch *t*-test was performed.

Regression analysis was performed to analyse the association between VDBP, 25-(OH)D<sub>T</sub>, 25-(OH)D<sub>F</sub>, levels of vitamin D metabolites and their ratios. Statistically significant models were adjusted for age, body mass and body fat, serum calcium, albumin, and iPTH.

All analyses were performed with R for Windows, version 4.1 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) [26] *p* < 0.05 was selected as the significance threshold.

## 3. Results

Results from 69 participants were included in the data analysis. The baseline characteristics between the groups are shown in Table 1. Athletes (indoor and outdoor) were younger than the inactive men group (inactive men vs. indoor, *p* < 0.001; inactive men vs. outdoor *p* < 0.001) (Table 1). Athletes exhibited a significantly lower percentage of body fat

**Table 1**  
Participant's characteristic.

	Mean ± SD Inactive men (n = 27)	Indoor (n = 18)	Outdoor (n = 24)
Age [years]	28.0 ± 4.0 <sup>a,b</sup>	23.0 ± 3.0	22.0 ± 4.0
Body weight [kg]	81.2 ± 13.3	81.8 ± 9.8	78.3 ± 6.1
Height [cm]	178.0 ± 6.0	181.0 ± 5.0	182.0 ± 6.0
Body fat [%]	14.9 ± 4.1 <sup>a,b</sup>	11.3 ± 2.0	10.6 ± 1.4
Calcium [mg/dL]	9.36 ± 0.36	9.91 ± 0.39	9.90 ± 0.43
Albumin-adjusted calcium [mg/dL]	9.38 ± 0.29	9.31 ± 0.39	9.34 ± 0.36
iPTH [pg/mL]	46.78 ± 18.19	48.76 ± 16.67	40.17 ± 19.17
Albumin [g/dL]	4.73 ± 0.22	4.75 ± 0.19	4.71 ± 0.18
25-(OH)D <sub>T</sub> [ng/mL]	21.53 ± 9.01	21.77 ± 9.92	22.86 ± 8.15
25-(OH)D <sub>3</sub> [ng/mL]	20.86 ± 9.06	21.11 ± 9.87	22.00 ± 8.35
25-(OH)D <sub>2</sub> [ng/mL]	0.67 ± 0.32	0.66 ± 0.35	0.86 ± 0.46
24,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> [ng/mL]	1.55 ± 0.91	1.57 ± 1.13	1.51 ± 0.96
3-epi-25-(OH)D <sub>3</sub> [ng/mL]	0.76 ± 0.35	0.78 ± 0.51	0.92 ± 0.50
1,25-(OH) <sub>2</sub> D [pg/mL]	35.18 ± 14.98	45.54 ± 23.41	40.40 ± 26.40
25-(OH)D <sub>3</sub> :24,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> VMR	16.11 ± 5.57	18.65 ± 11.17	17.43 ± 5.74
24,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> :25-(OH)D <sub>3</sub> × 100 VMR	6.85 ± 2.05	6.75 ± 2.00	6.34 ± 2.00
25-(OH)D <sub>3</sub> :3-epi-25-(OH) D <sub>3</sub> VMR	28.63 ± 6.65	30.03 ± 6.85	26.47 ± 6.75
1,25-(OH) <sub>2</sub> D:24,25- (OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> VMR	41.98 ± 60.34	84.25 ± 128.71	42.65 ± 36.92
VDBP [μmol/L]	1.99 ± 0.79	2.25 ± 0.41	2.48 ± 0.52
25-(OH)D <sub>F</sub> [pg/mL]	12.19 ± 5.72	11.19 ± 5.40	11.36 ± 4.76
25-(OH)D <sub>B</sub> [ng/mL]	5.18 ± 2.45	4.80 ± 2.30	4.84 ± 2.04
MET TOTAL [MET-min/ week]	1535.0 ± 939.6 <sup>a,b</sup>	10186.2 ± 3493.6	8097.3 ± 2199.0
Training volume [h/ week]	0.9 ± 0.4 <sup>a,b</sup>	15.6 ± 3.7 <sup>b</sup>	14.2 ± 2.9 <sup>a</sup>

iPTH – intact parathyroid hormone; VDBP – vitamin D binding protein; a – the mean value is significantly different from that of indoor athletes (*p* < 0.001); b – the mean value is significantly different from that of outdoor athletes (*p* < 0.001).

compared to inactive men (inactive men vs. indoor, *p* < 0.001; inactive men vs. outdoor *p* < 0.001). Inactive men weekly training hours were significantly lower than athletes (inactive men vs. indoor, *p* < 0.001; inactive men vs. outdoor *p* < 0.001). Indoor athletes weekly training hours were significantly higher than outdoor players (*p* < 0.001). We showed that 25-(OH)D<sub>T</sub>, 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>, 1,25-(OH)<sub>2</sub>D, VMRs (25-(OH)D<sub>3</sub>:24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>; 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>:25-(OH)D<sub>3</sub>; 25-(OH)D<sub>3</sub>:3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>; 1,25-(OH)<sub>2</sub>D:24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>), VDBP, 25-(OH)D<sub>F</sub>, 25-(OH)D<sub>B</sub> did not differ between the groups (Table 1). There was no differences in studied variables between inactive men and both groups of athletes when were combined.

### 3.1. Vitamin D metabolites

Regression analysis (Fig. 1a) showed a strong relationship between 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and 25-(OH)D<sub>T</sub> in each studied group (*p* < 0.001). In all groups, 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> was strongly associated with 25-(OH)D<sub>F</sub> (*p* < 0.001) (Fig. 2a).

Analysis (Fig. 1a) showed that 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> was strongly correlated with 25-(OH)D<sub>T</sub> in each group (*p* < 0.001). The association between 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> and 25-(OH)D<sub>F</sub> was observed in all groups (*p* < 0.001) (Fig. 2b).

Despite the direct enzymatic conversion of 25-(OH)D<sub>T</sub> to 1,25-(OH)<sub>2</sub>D we observed no association in serum concentrations between these two metabolites in all groups (Fig. 1c). In the group of outdoor players, the regression analysis showed that 1,25-(OH)<sub>2</sub>D was inversely associated with serum 25-(OH)D<sub>F</sub> (*p* < 0.05) (Fig. 2c).

Table 2 presents the association between 25-(OH)D<sub>T</sub>, 25-(OH)D<sub>F</sub>, and vitamin D metabolites, VMRs when all groups were combined. There was a strong relationship between 25-(OH)D<sub>T</sub>, 25-(OH)D<sub>F</sub>, and 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (*p* < 0.001), 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> (*p* < 0.001). Analysis showed that 25-(OH)D<sub>T</sub>, 25-(OH)D<sub>F</sub> was strongly, negatively correlated with 25-(OH)D<sub>3</sub>:24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 1,25-(OH)<sub>2</sub>D:24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (*p* < 0.001), and positively associated with 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>:25-(OH)D<sub>3</sub> (*p* < 0.001).

### 3.2. Vitamin D metabolites ratios

The 25-(OH)D<sub>3</sub>:24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> VMR was negatively correlated with 25-(OH)D<sub>T</sub> in each studied group (*p* < 0.001) (Fig. 1d). Analysis (Fig. 2d) showed that 25-(OH)D<sub>3</sub>:24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> VMR inversely associated with 25-(OH)D<sub>F</sub> in inactive men (*p* < 0.001), indoor (*p* < 0.01), and outdoor athletes (*p* < 0.001).

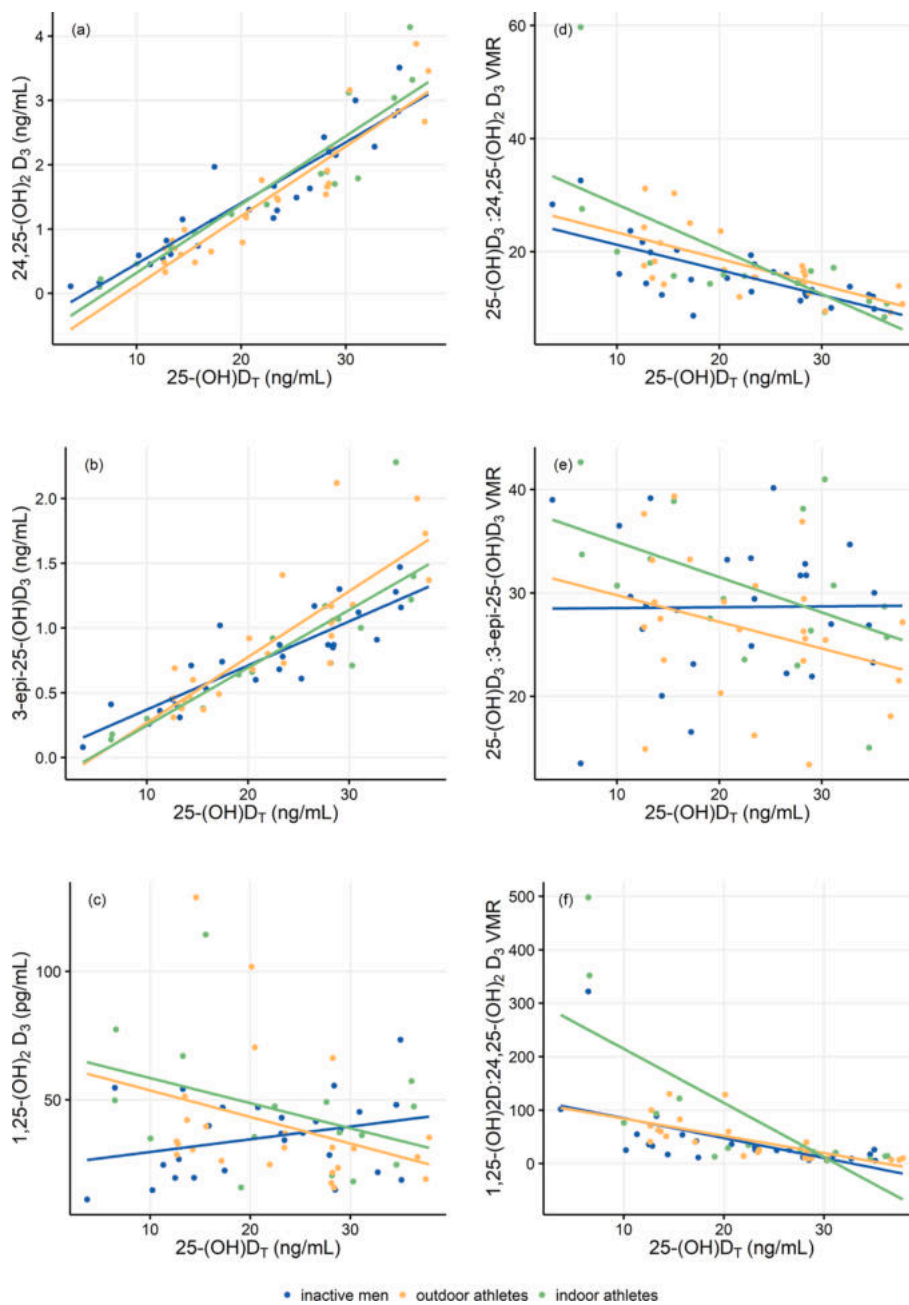
In indoor players, regression analysis (Fig. 1e, 2e) showed that the 25-(OH)D<sub>3</sub>:3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> VMR was negatively associated with 25-(OH)D<sub>T</sub> (*p* < 0.05) and 25-(OH)D<sub>F</sub> (*p* < 0.01). There was no correlation between these metabolites in inactive men and outdoor athletes.

According to our results, the VMR was strongly, negatively correlated with 25-(OH)D<sub>T</sub> in each group (*p* < 0.001) (Fig. 1f). Inverse association between 1,25-(OH)<sub>2</sub>D:24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> VMR and 25-(OH)D<sub>F</sub> was observed in inactive men (*p* < 0.01), indoor athletes (*p* < 0.001), and outdoor athletes (*p* < 0.001) (Fig. 2f).

Table 2 shows relationship between 25-(OH)D<sub>T</sub>, 25-(OH)D<sub>F</sub> and VMRs when all groups were combined. There was a strong inverse correlation between 25-(OH)D<sub>T</sub>, 25-(OH)D<sub>F</sub> and 25-(OH)D<sub>3</sub>:24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (*p* < 0.001), 1,25-(OH)<sub>2</sub>D:24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (*p* < 0.001) VMR. There was a strong association between 25-(OH)D<sub>T</sub>, 25-(OH)D<sub>F</sub> and 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>:25-(OH)D<sub>3</sub> × 100 VMR (*p* < 0.001).

### 3.3. Vitamin D metabolites, VMRs and VDBP

We performed regression analyses to explore possible associations between VDBP, 25-(OH)D<sub>T</sub>, 25-(OH)D<sub>F</sub>, and vitamin D metabolites, VMRs in inactive men and indoor and outdoor players. According to our results, there was no significant correlation between VDBP and vitamin D metabolites, VMRs in any of the groups.



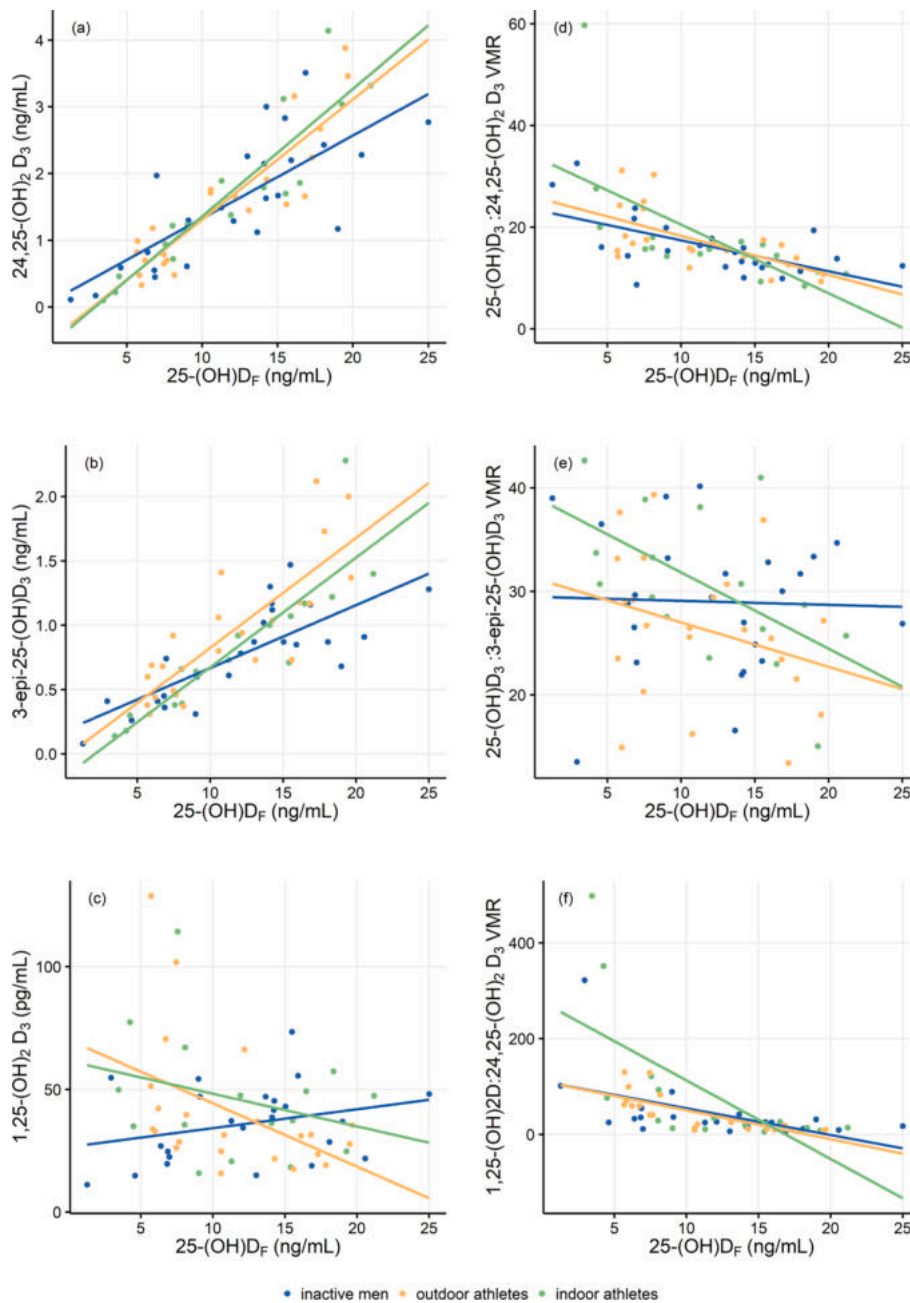
**Fig. 1.** Association between 25-(OH)D<sub>T</sub> and vitamin D metabolites 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (a), 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> (b), 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (c), and their ratios 25-(OH)D<sub>3</sub>:24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (d), 25-(OH)D<sub>3</sub>:3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> (e), 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>:24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (f) in inactive men, indoor and outdoor athletes.

#### 4. Discussion

To our knowledge, this is the first study investigating the effect of long-term, regular physical activity on vitamin D metabolome. In this study, we included inactive men and two groups of athletes. The primary aim of this study was to investigate whether regular, long-term physical activity, represented by two different kinds of physical efforts (judo and football), also featured by different durations of sun exposure (indoor vs. outdoor), influence resting concentration vitamin D metabolites.

First, we showed that the concentration of vitamin D metabolites did not differ in groups that had different physical activity level (inactive vs. athletes). Recent studies showed that a single exercise stimulus is enough to induce changes in 25-(OH)D and vitamin D metabolites. Sun et al. [15] documented that in a group of active, young adults, who performed a 30-min cycling exercise (at 70% of maximal oxygen uptake

(VO<sub>2max</sub>)), serum 25-(OH)D concentrations were significantly increased. Similarly, Dzik et al. [17] investigated whether a single bout of two types of exercise (VO<sub>2max</sub> test until exhaustion and three-times repeated 30 s Wingate Anaerobic test) could change 25-(OH)D blood concentration in young, trained boys. The authors showed that 25-(OH)D increased significantly after the exercise in both groups. There are also results indicated that a single endurance effort influences other vitamin D metabolites and their relative amount. Mieszkowski et al. [16] documented a significant increase in the levels of 25-(OH)D<sub>2</sub>, 25-(OH)D<sub>3</sub>, 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>, and 25-(OH)D<sub>3</sub>:24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ratio after a 240 km-mountain ultra-marathon. Authors observed also a significant decrease in 25-(OH)D<sub>3</sub>:3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> ratio immediately after the effort. To our knowledge, there are no studies that focus on the influence of regular, long-term physical activity on the concentration of vitamin D metabolites. Maintaining vitamin D status has been shown to



**Fig. 2.** Association between 25-(OH) $D_F$  vitamin D metabolites 24,25-(OH) $D_3$  (a), 3-epi-25(OH) $D_3$  (b), 1,25-(OH) $_2D_3$  (c), and their ratios 25-(OH) $D_3$ :24,25-(OH) $_2D_3$  (d), 25-(OH) $D_3$ :3-epi-25-(OH) $D_3$  (e), 1,25-(OH) $_2D_3$ :24,5-(OH) $_2D_3$  (f) in inactive men, indoor and outdoor athletes.

be related to exercise habits [27,28], and physical activity levels are significantly positively associated with 25-(OH)D levels [29]. However, in the current study, no differences were observed in vitamin D metabolome profile between inactive men and athletes training either indoor or outdoor (Table 1).

The free hormone hypothesis has been proposed as a universal mechanism for cellular uptake of steroid hormones since their highly lipophilic behaviour and the consequent potential to diffuse passively and rapidly across cell membranes [30,31]. One of the strongest arguments favouring the free hormone hypothesis is that individuals with mutation in VDBP gene may either alter the affinity (increased) for vitamin D metabolites or enhance the expression of VDBP. The effect is that much more 25-(OH)D is bound to VDBP and, therefore, a little 25-(OH)D is available to  $1\alpha$ -hydroxylation. The clinical impact of this mutation is low because the passive diffusion through the membrane is

always along the gradient [30,32]. Therefore, some functions of vitamin D may be more closely related to the free fraction of vitamin D than to the total serum concentrations [7,33]. Current studies showed that direct measurement of free 25-(OH)D metabolite concentrations might avoid potential errors inherent in calculating free metabolite levels and is thus the preferred method for free vitamin D metabolite determinations. However, experience with direct measurements of the free 25-(OH)D concentrations is limited, what might be related with racial differences and physiological conditions [7]. Therefore, current important issue related with assessment of vitamin D status is the availability of a high throughput assay that can be performed by most clinical laboratories to measure the free 25-(OH)D, and evaluation of its role in clinical, sport medicine and in the research laboratory.

We considered whether the free fraction of 25-(OH)D correlates stronger with vitamin D metabolites and VMRs than total 25-(OH)D. The

**Table 2**

Association of 25-(OH)D<sub>T</sub>, 25-(OH)D<sub>F</sub> with vitamin D metabolites and ratios by regression analyses\* in all group (n = 69).

Vitamin D metabolites and ratios	25-(OH)D <sub>T</sub> [ng/ml]		25-(OH)D <sub>F</sub> [ng/ml]	
	β (95% CI)	p-value	β (95% CI)	p-value
24,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> [ng/mL]	0.0921 (0.825–1.016)	<0.001	0.842 (0.706–0.977)	<0.001
3-epi-25-(OH)D <sub>3</sub> [ng/mL]	0.831 (0.695–0.967)	<0.001	0.779 (0.622–0.936)	<0.001
1,25-(OH) <sub>2</sub> D [pg/mL]	–0.149 (–0.391–0.093)	0.23	–0.186 (–0.432–0.061)	0.14
25-(OH)D <sub>3</sub> :24,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> VMR	–0.645 (–0.832–0.458)	<0.001	–0.591 (–0.794–0.389)	<0.001
24,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> :25-(OH)D <sub>3</sub> × 100 VMR	0.708 (0.535–0.881)	<0.001	0.644 (0.453–0.836)	<0.001
25-(OH)D <sub>3</sub> :3-epi-25-(OH)D <sub>3</sub> VMR	–0.227 (–0.466–0.011)	0.062	–0.245 (–0.488–0.001)	0.049
1,25-(OH) <sub>2</sub> D:24,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> VMR	–0.588 (–0.786–0.390)	<0.001	–0.546 (–0.756–0.335)	<0.001

\* Statistically significant variables were adjusted for age, body mass, and body fat, serum calcium, albumin and iPTH; β, unstandardized coefficient; 95% CI, confidence interval;

correlation between serum concentrations of 25-(OH)D<sub>T</sub> and 24,25-(OH)<sub>2</sub>D was demonstrated in previous reports [34–37]. In our study, we also showed strong associations between 25-(OH)D<sub>T</sub>, 25-(OH)D<sub>F</sub> and 24,25-(OH)<sub>2</sub>D levels. Shieh et al. [38] documented that, in vitamin D-deficient adults, both total and free 25-(OH)D were associated with increased 24,25-(OH)<sub>2</sub>D, but the association was stronger with free 25-(OH)D [38]. Currently, the relationships between free and total vitamin D metabolite levels on markers of vitamin D status such as bone markers and parathyroid hormone (PTH) levels do not clearly demonstrate the superiority of free to total measurements. However, it is possible that free vitamin D measurements will play an increasingly important role in assessing vitamin D status, and the availability of a high-throughput assay that can be performed by most clinical laboratories to measure free 25-(OH)D should stimulate further evaluation of its role in clinical medicine and the research laboratory.

As described earlier, serum 25-(OH)D<sub>T</sub> concentration is a marker of vitamin D status. Although it is highly relevant for total and bioavailable vitamin D concentrations, VDBP is not included in most studies that examine vitamin D deficiency and health measures in athletes. The validity of the commonly used laboratory test of serum 25-(OH)D<sub>T</sub> concentration in the assessment of vitamin D deficiency is being questioned [32]. Substantial progress has been made in the analysis of vitamin D metabolites via LC–MS/MS methods are capable of accurately measuring multiple vitamin D metabolites in parallel. Therefore, other vitamin D metabolites have recently attracted much attention in the assessment of vitamin D status.

Recent findings suggest that adequacy of vitamin D may be reflected by concentrations of serum 24,25-(OH)<sub>2</sub>D [34,36]. 24,25-(OH)<sub>2</sub>D is the predominant catabolite of 25-(OH)D that is produced in the liver by the action of CYP2A1, when sufficient amounts of 25-(OH)D are available [9]. CYP2A1 expression is up-regulated by 1,25-(OH)<sub>2</sub>D and fibroblast growth factor 23 (FGF23) and down-regulated by PTH. Furthermore, it is partly regulated by VDR activity [31,39]. While there are sufficient levels of biologically active vitamin D, and CYP2A1 activity is adequate, calculation of 25-(OH)D:24,25-(OH)<sub>2</sub>D ratio allows a better indication of the catabolic clearance operated by CYP2A1. The 25-(OH)D to 24,25-(OH)<sub>2</sub>D molar ratio has been suggested to 24,25-(OH)<sub>2</sub>D may be a better index of vitamin D deficiency in healthy individuals, since it is not affected by race [31,36]. Furthermore, Ginsberg et al. [13] suggested that VMR (24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>:25(OH)D<sub>3</sub>) is designed to have advantages as a marker of vitamin D stores replenishment compared to 25-(OH)D because the hypothesis of independence from VDBP concentrations. Although vitamin D metabolite concentrations (25-(OH)D<sub>3</sub>,

24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) are directly and strongly associated with VDBP concentrations, the VMR was independent of VDBP concentrations in a diverse cohort of older people living in the black and white community. Authors suggested that their findings support a wider use of the VMR as a method to overcome limitations in 25-(OH)D as a marker of vitamin D sufficiency [13]. However, our result do not confirm this hypothesis. Indeed, we showed that there was no correlation between vitamin D metabolites (25-(OH)D<sub>3</sub>, 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>, 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>), VMRs and VDBP in inactive mean and both groups of athletes.

We also showed that 25-(OH)D<sub>T</sub>, 25-(OH)D<sub>F</sub> negatively correlate with 1,25-(OH)<sub>2</sub>D:24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> VMR in each group. Similarly to our results, Tang et al. [35] documented the inverse correlation between 25-(OH)D<sub>T</sub> and VMRs (25-(OH)D:24,25-(OH)<sub>2</sub>D, 1,25-(OH)<sub>2</sub>D:24,25-(OH)<sub>2</sub>D) in group of 940 British Army recruits. Cashman et al. [40] observed the inverse association between serum 25-(OH)D<sub>3</sub>:24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and 25-(OH)D<sub>3</sub> in 134 Irish adults. The 24-hydroxylase pathway results in the formation of calcitric acid for excretion. In hypovitaminosis D, the 24,25-(OH)<sub>2</sub>D pathway is partially inactivated to save 25-(OH)D and to maintain an adequate supply of substrate for conversion to 1,25-(OH)<sub>2</sub>D [35,37]. Tang et al. [35] suggested that, when vitamin D status is insufficient, a progressive and highly significant increase in the ratio may be an evidence that serum the production of serum 1,25-(OH)<sub>2</sub>D is favoured over 24,25-(OH)<sub>2</sub>D as the availability of vitamin D precursors in the circulation diminishes. Low 24,25-(OH)<sub>2</sub>D relative to 1,25-(OH)<sub>2</sub>D (high 1,25-(OH)<sub>2</sub>D:24,25-(OH)<sub>2</sub>D) can upregulate PTH secretion and improve the effects of vitamin D. Otherwise, if 24,25-(OH)<sub>2</sub>D is itself biologically active, a low 1,25-(OH)<sub>2</sub>D:24,25-(OH)<sub>2</sub>D may be beneficial [35,37].

A strength of this study is represented by the chosen homogeneous cohort, and participants attend blood drawing visits at strictly controlled time in 2 weeks. A second one is represented by the fact that all vitamin D metabolites were measured using gold standard methodologies.

On the other side, some weaknesses warrant mention: the relatively limited sample size, the observational nature of the study based on a cohort of young, healthy subjects, of Caucasian extraction, thus limiting the extrapolation to a wider population of mixed ethnicity. We evaluated 25-(OH)D<sub>F</sub> concentrations using a calculated method rather than a direct measurement of free vitamin D metabolite levels. Moreover, the VDBP genotype has not been determined.

## 5. Conclusion

In conclusion, the present analysis showed that regular, long-term physical activity has no effect on resting concentrations of vitamin D metabolites. We also showed that free vitamin D does not correlate stronger with vitamin D metabolites and VMRs compared to total. More priority research is needed to better understanding of the contribution of vitamin D metabolites, VMRs to 25-(OH)D<sub>T</sub>, 25-(OH)D<sub>F</sub> measurement. The additional research should explore benefit of 24,25-(OH)<sub>2</sub>D, 3-epi-25-(OH)D, and molar ratios with 25-(OH)D in the matter of informing vitamin D status.

## CRedit authorship contribution statement

**Anna Książek:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Data curation, Writing - original draft. **Aleksandra Zagrodna:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Data curation. **Giovanni Lombardi:** Conceptualization, Methodology, Writing - review & editing. **Małgorzata Słowińska-Lisowska:** Conceptualization, Methodology, Writing - review & editing.

## Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence

the work reported in this paper.

### Data availability

Data will be made available on request.

### Acknowledgements

We gratefully acknowledge all the participants for their interest and commitment in this study.

### Funding statement

This research was supported financially by the Wrocław University of Health and Sport Sciences, Poland (Z.19.03).

### References

- M.F. Holick, The vitamin D deficiency pandemic: Approaches for diagnosis, treatment and prevention, *Rev Endocr Metab Disord* 18 (2) (2017) 153–165.
- F. Farrokhyar, R. Tabasinejad, D. Dao, D. Peterson, O.R. Ayeni, R. Hadioozadeh, M. Bhandari, Prevalence of vitamin D inadequacy in athletes: a systematic-review and meta-analysis, *Sports medicine (Auckland, N.Z.)* 45 (3) (2015) 365–378.
- T. Harju, B. Gray, A. Mavroedi, A. Farooq, J.J. Reilly, Prevalence and novel risk factors for vitamin D insufficiency in elite athletes: systematic review and meta-analysis, *Eur. J. Nutr.* 61 (8) (2022) 3857–3871.
- P. Messa, M. Curreri, A. Regalia, C.M. Alfieri, Vitamin D and the cardiovascular system: an overview of the recent literature, *American journal of cardiovascular drugs : drugs, devices, and other interventions* 14 (1) (2014) 1–14.
- P.J. Martens, C. Gysemans, A. Verstyuf, A.C. Mathieu, Vitamin D's Effect on Immune Function, *Nutrients* 12 (5) (2020).
- C.M. Latham, C.R. Brightwell, A.R. Keeble, B.D. Munson, N.T. Thomas, A. M. Zagzoog, C.S. Fry, J.L. Fry, Vitamin D Promotes Skeletal Muscle Regeneration and Mitochondrial Health, *Front. Physiol.* 12 (2021).
- D.D. Bikle, S. Malmstroem, J. Schwartz, Current controversies: Are free vitamin metabolite levels a more accurate assessment of vitamin D status than total levels? *Endocrinol Metab Clin North Am* 46 (4) (2017) 901–918.
- D.D. Bikle, J. Schwartz, Vitamin D binding protein, total and free vitamin D levels in different physiological and pathophysiological conditions, *Front. Endocrinol.* 10 (317) (2019).
- N. Alonso, S. Zelzer, G. Eibinger, M. Herrmann, Vitamin D metabolites: Analytical challenges and clinical relevance, *Calcif. Tissue Int.* (2022).
- W.J. Ribbans, R. Aujla, S. Dalton, J.A. Nunley, Vitamin D and the athlete-patient: state of the art, *Journal of ISAKOS : joint disorders & orthopaedic sports medicine* 6 (1) (2021) 46–60.
- C.E. Powe, M.K. Evans, J. Wenger, A.B. Zonderman, A.H. Berg, M. Nalls, H. Tamez, D. Zhang, I. Bhan, S.A. Karumanchi, N.R. Powe, R. Thadhani, Vitamin D-binding protein and Vitamin D status of black americans and white americans, *N. Engl. J. Med.* 369 (21) (2013) 1991–2000.
- P. Lanteri, G. Lombardi, A. Colombini, G. Banfi, Vitamin D in exercise: physiologic and analytical concerns, *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 415 (2013) 45–53.
- C. Ginsberg, A.N. Hoofnagle, R. Katz, J.O. Becker, S.B. Kritchevsky, M.G. Shlipak, M.J. Sarnak, J.H. Ix, The vitamin D metabolite ratio is independent of vitamin D binding protein concentration, *Clin. Chem.* 67 (2) (2020) 385–393.
- A. Hengist, O. Perkin, J.T. Gonzalez, J.A. Betts, M. Hewison, K.N. Manolopoulos, K. S. Jones, A. Koulman, D. Thompson, Mobilising vitamin D from adipose tissue: The potential impact of exercise, *Nutr. Bull.* 44 (1) (2019) 25–35.
- X. Sun, Z.B. Cao, H. Taniguchi, K. Tanisawa, M. Higuchi, Effect of an acute bout of endurance exercise on serum 25(OH)D concentrations in young adults, *J Clin Endocrinol Metab* 102 (11) (2017) 3937–3944.
- J. Mieszowski, B. Stankiewicz, A. Kochanowicz, B. Niespodziński, T. Kowalik, M. Żmijewski, K. Kowalski, R. Rola, T. Bienkowski, J. Antosiewicz, Ultra-marathon-induced increase in serum levels of vitamin D metabolites: A double-blind randomized controlled trial, *Nutrients* 12 (12) (2020).
- K.P. Dzik, T. Grzywacz, M. Łuszczczyk, S. Kujach, D.J. Flis, J.J. Kaczor, Single bout of exercise triggers the increase of vitamin D blood concentration in adolescent trained boys: a pilot study, *Sci Rep* 12 (1) (2022) 1825.
- D.J. Harriss, A. MacSween, G. Atkinson, Ethical standards in sport and exercise science research: 2020 Update, *Int J Sports Med* 40 (13) (2019) 813–817.
- A. Książek, A. Zagrodna, M. Słowińska-Lisowska, G. Lombardi, Relationship between metabolites of vitamin D, Free 25-(OH) D, and physical performance in indoor and outdoor athletes, *Front. Physiol.* (2022) 1211.
- R.T. Withers, N.P. Craig, P.C. Bourdon, K.I. Norton, Relative body fat and anthropometric prediction of body density of male athletes, *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 56 (2) (1987) 191–200.
- W.E. Siri, Body composition from fluid spaces and density: analysis of methods. 1961, *Nutrition* 9 (5) (1993) 480–491, discussion 480, 492.
- R. Rola, K. Kowalski, T. Bienkowski, S. Studzińska, Improved sample preparation method for fast LC-MS/MS analysis of vitamin D metabolites in serum, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 190 (2020), 113529.
- D.D. Bikle, E. Gee, B. Halloran, M.A. Kowalski, E. Ryzen, J.G. Haddad, Assessment of the free fraction of 25-hydroxyvitamin D in serum and its regulation by albumin and the vitamin D-binding protein, *J Clin Endocrinol Metab* 63 (4) (1986) 954–959.
- C.L. Craig, A.L. Marshall, M. Sjöström, A.E. Bauman, M.L. Booth, B.E. Ainsworth, M. Pratt, U. Ekelund, A. Yngve, J.F. Sallis, P. Oja, International physical activity questionnaire: 12-country reliability and validity, *Med. Sci. Sports Exerc.* 35 (8) (2003) 1381–1395.
- B.E. Ainsworth, W.L. Haskell, M.C. Whitt, M.L. Irwin, A.M. Swartz, S.J. Strath, W.L. O. Brien, D.R. Bassett, K.H. Schmitz, P.O. Emplancourt, Compendium of physical activities: an update of activity codes and MET intensities, *Med. Sci. Sports Exerc.* 32 (9) (2000) S498–S504.
- R.C. Team, R: A language and environment for statistical computing [Computer software], Vienna, Austria: R foundation for statistical computing (2016).
- M. Touvier, M. Deschasaux, M. Montourcy, A. Sutton, N. Charnaux, E. Kesse-Guyot, K.E. Assmann, L. Fezeu, P. Latino-Martel, N. Druenes-Pecollo, C. Guinot, J. Latreille, D. Malvy, P. Galan, S. Hercberg, S. Le Clerc, J.C. Souberbielle, K. Ezzedine, Determinants of vitamin D status in Caucasian adults: influence of sun exposure, dietary intake, sociodemographic, lifestyle, anthropometric, and genetic factors, *J. Invest. Dermatol.* 135 (2) (2015) 378–388.
- M. Wanner, A. Richard, B. Martin, J. Linseisen, S. Rohrmann, Associations between objective and self-reported physical activity and vitamin D serum levels in the US population, *Cancer causes & control : CCC* 26 (6) (2015) 881–891.
- R. Scragg, I. Holdaway, V. Singh, P. Metcalf, J. Baker, E. Dryson, Serum 25-hydroxyvitamin D3 is related to physical activity and ethnicity but not obesity in a multicultural workforce, *Aust. N. Z. J. Med.* 25 (3) (1995) 218–223.
- D.D. Bikle, The free hormone hypothesis: When, why, and how to measure the free hormone levels to assess vitamin D, thyroid, sex hormone, and cortisol status, *JBM plus* 5 (1) (2021) e10418.
- K. Makris, C. Sempos, E. Cavalier, The measurement of vitamin D metabolites part II—the measurement of the various vitamin D metabolites, *Hormones* 19 (2) (2020) 97–107.
- O. Tsuprykov, X. Chen, C.F. Hoche, R. Skoblo, Y. Lianghong, B. Hoche, Why should we measure free 25(OH) vitamin D? *J Steroid Biochem Mol Biol* 180 (2018) 87–104.
- D.J. Owens, R. Allison, G.L. Close, Vitamin D and the athlete: current perspectives and new challenges, *Sports medicine (Auckland)* 48 (2018) 3–16.
- J.C.Y. Tang, H. Nicholls, I. Piec, C.J. Washbourne, J.J. Dutton, S. Jackson, J. Greeves, W.D. Fraser, Reference intervals for serum 24,25-dihydroxyvitamin D and the ratio with 25-hydroxyvitamin D established using a newly developed LC-MS/MS method, *J. Nutr. Biochem.* 46 (2017) 21–29.
- J.C.Y. Tang, S. Jackson, N.P. Walsh, J. Greeves, W.D. Fraser, N. Ball, J. Dutton, H. Nicholls, I. Piec, C.J. Washbourne, t. Bioanalytical Facility, The dynamic relationships between the active and catabolic vitamin D metabolites, their ratios, and associations with PTH, *Sci. Rep.* 9 (1) (2019) 6974.
- A.H. Berg, C.E. Powe, M.K. Evans, J. Wenger, G. Ortiz, A.B. Zonderman, P. Suntharalingam, K. Lucchesi, N.R. Powe, S.A. Karumanchi, R.I. Thadhani, 24,25-Dihydroxyvitamin d3 and vitamin D status of community-dwelling black and white Americans, *Clin Chem* 61 (6) (2015) 877–884.
- M. Kaufmann, J.C. Gallagher, M. Peacock, K.P. Schlingmann, M. Konrad, H. F. DeLuca, R. Siqueiro, B. Lopez, A. Mourino, M. Maestro, R. St-Arnaud, J. S. Finkelstein, D.P. Cooper, G. Jones, Clinical utility of simultaneous quantitation of 25-hydroxyvitamin D and 24,25-dihydroxyvitamin D by LC-MS/MS involving derivatization with DMEQ-TAD, *J Clin Endocrinol Metab* 99 (7) (2014) 2567–2574.
- A. Shieh, C. Ma, R.F. Chun, J. Wittwer-Schegg, L. Swinkels, T. Huijs, J. Wang, I. Donangelo, M. Hewison, J.S. Adams, Associations between change in total and free 25-hydroxyvitamin D with 24,25-dihydroxyvitamin D and parathyroid hormone, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 103 (9) (2018) 3368–3375.
- J.W. Pike, M.B. Meyer, Regulation of mouse Cyp24a1 expression via promoter-proximal and downstream-distal enhancers highlights new concepts of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) action, *Arch. Biochem. Biophys.* 523 (1) (2012) 2–8.
- K.D. Cashman, A. Hayes, K. Galvin, J. Merkel, G. Jones, M. Kaufmann, A. N. Hoofnagle, G.D. Carter, R.A. Durazo-Arviso, C.T. Sempos, Significance of serum 24,25-dihydroxyvitamin D in the assessment of vitamin D status: a double-edged sword? *Clin Chem* 61 (4) (2015) 636–645.



## OPEN ACCESS

## EDITED BY

Cain Craig Truman Clark,  
Coventry University, United Kingdom

## REVIEWED BY

Jedrzej Antosiewicz,  
Medical University of Gdansk, Poland  
Alessandra Bosutti,  
University of Trieste, Italy

## \*CORRESPONDENCE

Anna Książek,  
✉ anna.ksiazek@awf.wroc.pl

RECEIVED 14 July 2023

ACCEPTED 03 October 2023

PUBLISHED 16 October 2023

## CITATION

Książek A, Zagrodna A, Lombardi G and  
Stowińska-Lisowska M (2023), Seasonal  
changes in free 25-(OH)D and vitamin D  
metabolite ratios and their relationship  
with psychophysical stress markers in  
male professional football players.  
*Front. Physiol.* 14:1258678.  
doi: 10.3389/fphys.2023.1258678

## COPYRIGHT

© 2023 Książek, Zagrodna, Lombardi and  
Stowińska-Lisowska. This is an open-  
access article distributed under the terms  
of the [Creative Commons Attribution  
License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or  
reproduction in other forums is  
permitted, provided the original author(s)  
and the copyright owner(s) are credited  
and that the original publication in this  
journal is cited, in accordance with  
accepted academic practice. No use,  
distribution or reproduction is permitted  
which does not comply with these terms.

# Seasonal changes in free 25-(OH)D and vitamin D metabolite ratios and their relationship with psychophysical stress markers in male professional football players

Anna Książek<sup>1\*</sup>, Aleksandra Zagrodna<sup>1</sup>, Giovanni Lombardi<sup>2,3</sup> and  
Małgorzata Stowińska-Lisowska<sup>1</sup><sup>1</sup>Department of Biological and Medical Basis of Sport, Faculty of Physical Education and Sports, Wrocław University of Health and Sport Sciences, Wrocław, Poland, <sup>2</sup>Laboratory of Experimental Biochemistry and Molecular Biology, I.R.C.C.S. Istituto Ortopedico Galeazzi, Milan, Italy, <sup>3</sup>Department of Athletics, Strength and Conditioning, Poznań University of Physical Education, Poznań, Poland

**Introduction:** Novel markers of vitamin D status are currently being investigated, including free 25-(OH)D (25-(OH)D<sub>F</sub>) and the vitamin D metabolite ratio (24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>:25-(OH)D<sub>3</sub>; VMR). The VMR may provide additional functional information on vitamin D metabolism in athletes. Therefore, the main objective of the current study was to evaluate 25-(OH)D<sub>F</sub>, bioavailable 25-(OH)D (25-(OH)D<sub>B</sub>), VMR, and psychophysical stress markers during different training periods over a half-season. The second aim was to assess the association between vitamin D binding protein (VDBP), total and free 25-(OH)D, VMRs, and psychophysical stress markers in professional football players. Moreover, we examined the relationship between 25-(OH)D<sub>3</sub> and vitamin D metabolites (24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>) to determine if training loads in different training periods influenced the vitamin D metabolome.

**Methods:** Twenty professional football players were tested at six different time points across half a year (V1—June; V2—July; V3—August; V4—October; V5—December; V6—January).

**Results:** Analyses indicated a significant seasonal rhythm for VDBP, and total 25-(OH)D (25-(OH)D<sub>T</sub>), 25-(OH)D<sub>B</sub>, 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>, 25-(OH)D<sub>3</sub>:24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, and 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>:25-(OH)D<sub>3</sub> VMRs throughout the training period. No correlation was detected between 25-(OH)D<sub>T</sub>, 25-(OH)D<sub>B</sub>, 25-(OH)D<sub>F</sub>, vitamin D metabolites, VMRs, VDBP, and ferritin, liver enzymes (aspartate transaminase [AST] and alanine transaminase [ALT]), creatine kinase (CK), cortisol, testosterone, and testosterone-to-cortisol ratio (T/C) in each period (V1–V6). However, there was a strong statistically significant correlation between 25-(OH)D<sub>3</sub> and 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in each training period.

**Conclusion:** In conclusion, a seasonal rhythm was present for VDBP, 25-(OH)D<sub>T</sub>, 25-(OH)D<sub>B</sub>, vitamin D metabolites (24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>), and VMRs (25-(OH)D<sub>3</sub>:24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 25-(OH)D<sub>3</sub>:3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>). However, no rhythm was detected for 25-(OH)D<sub>F</sub> and markers of psychophysical stress (ferritin, liver enzymes, CK, testosterone, cortisol, and T/C ratio). Moreover, the relationships between free and total 25-(OH)D with psychophysical stress markers did not demonstrate the superiority of free over total measurements. Furthermore,

training loads in different training periods did not affect resting vitamin D metabolite concentrations in football players.

#### KEYWORDS

vitamin D, 24, 25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, VMR, training load, athletes, seasonal variation

## 1 Introduction

Vitamin D is an important compound related to many aspects of athletic performance and recovery, with the most studied functions of vitamin D concerning bone (Herrmann et al., 2017) and skeletal muscle health (Dzik and Kaczor, 2019). Furthermore, vitamin D plays a vital role in modulating the functions of many other tissues that are important in a sports context, including those impacting immune (Martens et al., 2020) and cardiac function (Messa et al., 2014). Vitamin D status is a common topic in sports science due to the high prevalence of vitamin D insufficiency in athletes (Farrokhyar et al., 2015; Harju et al., 2022), which can negatively influence musculoskeletal function, power, force production, and recovery from fractures (Owens et al., 2018; Ribbans et al., 2021). All of these factors are pivotal for athletes as they may have impact on sport performance and general health.

In most athlete trials, serum 25-(OH)D<sub>T</sub> level is a biomarker of vitamin D status due to its relatively long half-life. Consistent with the free hormone hypothesis (Chun et al., 2014), only the non-bound fraction (the free fraction, 25-(OH)D<sub>F</sub>) can enter cells and exert its biological effects (Bikle, 2021). Some studies have shown that some vitamin D functions may be closely related to its free fraction than to VDBP bound 25-(OH)D<sub>T</sub> concentrations (Powe et al., 2011; Shieh et al., 2018). VDBP levels and activities influence vitamin D bioavailability, altering the balance between free and bound vitamin D fractions (Bouillon et al., 2019). In such circumstances, 25-(OH)D<sub>T</sub> concentration estimations may be misleading.

Some studies suggest (Cashman et al., 2015; Ginsberg et al., 2020) that evaluating the molar ratio of 24,25-(OH)<sub>2</sub>:25-(OH)D may be a better index of vitamin D insufficiency in healthy men (Alonso et al., 2022) as it is not affected by race (Berg et al., 2015). Recent evidence demonstrates that VMR strongly associates with higher bone mineral density (Ginsberg et al., 2018) and parathyroid hormone (PTH) (Bosworth et al., 2012) than 25-(OH)D<sub>T</sub>. Therefore, VMR may provide additional functional information on vitamin D metabolism in athletes.

The vitamin D receptor (VDR) is expressed in skeletal muscle and has essential roles in maintaining mitochondrial function and recovery (Latham et al., 2021). Latest evidence indicates that vitamin D signaling contributes to muscle regeneration. In animal models, VDR protein expression associates closely with 25-(OH)D serum concentration (Srikuea et al., 2020). The VDR and vitamin D-activating enzyme CYP27B1 are expressed at a low level in homeostatic skeletal muscle *in vitro* and *in vivo*, evidenced by immunocytochemical and immunohistochemical visualization and immunoblotting in C2C12 myoblasts and whole mouse muscle (Srikuea et al., 2012; Srikuea et al., 2020; Latham et al., 2021). Vitamin D play role in muscle regeneration supported by rapidly raised Pax7 and VDR protein expression in skeletal muscle to take action on the repair response after an acute bout of damaging high-intensity physical effort (Puangthong et al., 2021),

demonstrating that the myogenic repair and vitamin D systems are both rapidly and contemporaneously initiated after skeletal muscle damage (Latham et al., 2021).

There are several studies on seasonal 25-(OH)D<sub>T</sub> concentration changes in athletes (Lombardi et al., 2017; Vitale et al., 2018; Krzywański et al., 2020) though there are none on seasonal changes in 25-(OH)D<sub>F</sub> and VMR variations. Moreover, fewer studies considered the different training periods in conjunction with vitamin D metabolites and VMRs. The main aim of the current study was to assess 25-(OH)D<sub>F</sub>, VMRs, (25-(OH)D<sub>3</sub>:24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 25-(OH)D<sub>3</sub>:3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>, 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>:25-(OH)D<sub>3</sub>), and psychophysical stress markers (ferritin, liver enzymes, creatine kinase [CK], testosterone, and cortisol) during different periods of the training season. The second aim was to examine the association between VDBP, total, bioavailable and free 25-(OH)D, VMRs, and psychophysical stress markers in professional football players. In addition, we assessed whether training loads in different training periods influenced the vitamin D metabolome. Therefore, we examined the relationship between 25-(OH)D<sub>3</sub> and vitamin D metabolites (24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>) in this cohort.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Study design, participants, and blood draws

Forty-two football players were recruited from one club competing in the highest male football Polish league, the “Ekstraklasa,” providing a total of 180 records. After initial screening, the study included 20 participants with a mean age of 26.9 ± 4.7 years. Athletes with injuries, those not present at more than two blood draws, and participants who used calcium (Ca) or vitamin D supplementation were excluded. However, sporadic vitamin D intake was permitted. The competitors who participated in the study were active in all training periods and had similar athletic performance levels, career duration, and training loads.

Blood draws followed the first round of the Polish “PKO BP Ekstraklasa” from June 2021 to January 2022. Sample collections were performed in June - V1 (before the pre-season), July—V2 (after the pre-season), August - V3 (during the competitive season), October - V4 (during the competitive season), December—V5 (after the competitive season), and January - V6 (after off-season). The team trained regularly and played at latitudes between 50° and 54°N. Table 1 details the content of each of the training periods, considering different training sessions and durations.

### 2.2 Biochemical analyses

Blood samples were collected into plain tubes containing a clot activator (Vacutest, Kima, Italy), stored at room temperature for



**TABLE 1 Training content for each of the training periods.**

Day	Period	V1		V2		V3		V4		V5		V6	
		Before the pre-season		After the pre-season		During the competitive season		During the competitive season		After the competitive season		After the off-season	
		Duration		Duration		Duration		Duration		Duration		Duration	
Monday	M	60'	ITS	90'	CT		rest	70'	CT/TEC	95'	CT/TEC	45'	ITS
	A		Rest	80'	CT/TEC		rest		rest		rest		rest
Tuesday	M	45'	ITS	80'	CT	90'	CT/TEC	80'	CT	95'	CT/TEC	60'	ITS
	A		Rest	80'	TAC	80'	TAC	80'	TAC		rest		rest
Wednesday	M		Rest		rest		rest	60'	TAC		rest		rest
	A	60'	ITS	100'	CT/TEC	65'	CT/TAC		rest		rest	60'	ITS
Thursday	M		Rest	70'	CT/TEC	115'	CT/TEC	60'	CT/TEC	50'	CT/TEC		rest
	A	60'	ITS	60'	TAC		rest		rest		rest	90'	ITS
Friday	M		Rest	60'	CT	50'	TEC	60'	CT/TEC	80'	CT/TEC		rest
	A	45'	ITS	90'	TEC		rest		rest		rest	45'	ITS
Saturday	M		Rest	90'	FG	50'	TAC		rest	40'	TAC		Rest
	A		Rest		rest		rest	90'	LG		rest		Rest
Sunday	M		Rest		rest	90'	LG		rest		rest		Rest
	A		Rest		rest		rest		rest	90'	LG		Rest

M, morning; A, afternoon; ITS, individual training session; CT, conditioning training (interval training, strength training, stamina training, speed training); TAC, tactical training; TEC, technical training; FG, friendly game; LG, league game.

1 hour, then centrifuged at 1300 g for 10 minutes at 22 °C. Serum aliquots were stored at –80°C until assayed.

As previously described (Książek et al., 2022), total serum Ca was determined by colorimetric assay using the Konelab 60 system (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France). Albumin was assayed on a Siemens Dimension Xpand Plus clinical chemistry system (Siemens, Munich, Germany).

Albumin-adjusted Ca (ACa) was calculated using the formula:

$$\text{ACa (mg/dL)} = \text{Ca (mg/dL)} + [(4 - \text{albumin (g/dL)}) \times 0.8]$$

Intact PTH (iPTH) was determined in serum by an electrochemiluminescence assay (ECLIA) on an Elecsys analyzer (Roche, Basel, Switzerland). The intra- and inter-assay coefficients of variation (CVs) were 4.5% and 4.8%, respectively, and the limit of detection was at 1.20 pg .mL<sup>-1</sup> (0.127 pmol .L<sup>-1</sup>).

Plasma CK activity was evaluated using diagnostic kits for the Konelap 60 kinetic enzyme analyzer (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France). The CK detection limit for the kits was 6 U/L, with an intra-assay CV of 1.85%.

Serum ferritin and cortisol levels were measured by ECLIA on the Cobas e601 analyzer (Roche, Mannheim, Germany). Intra-assay and inter-assay CVs for ferritin and cortisol were 2.5% and 8.1%, and 5.4% and 10.1%, respectively. Serum total testosterone was measured by ECLIA on the Cobas e411 analyzer (Roche, Mannheim, Germany) and had intra-assay and inter-assay CVs of 4.7% and 8.4%, respectively.

The testosterone-to-cortisol ratio (T/C) was calculated as a surrogate marker of overtraining and psychophysical stress.

Aspartate transaminase (AST) and alanine transaminase (ALT) levels were measured by enzymatic assay on the Alinity m analyzer (Abbott Laboratories, IL, USA). The AST intra- and inter-assay CVs were 0.7% and 1.0%, respectively, and the limit of detection was 3 U/L. The ALT intra- and inter-assay CVs were 0.9% and 1.5%, respectively, and the limit of detection was 2 U/L.

## 2.3 Vitamin D metabolite levels

Vitamin D metabolite levels 25-(OH)D<sub>3</sub>, 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, and 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>, and 25-(OH)D<sub>3</sub>-to-24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 25-(OH)D<sub>3</sub>-to-3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>, and 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-to-25-(OH)D<sub>3</sub> ratios were quantitatively determined by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS).

Vitamin D metabolite standards (25-(OH)D<sub>3</sub>, 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>, 25-(OH)D<sub>2</sub>, 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) and isotope internal standards (25-(OH)D<sub>3</sub>-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>, 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>, 25-(OH)D<sub>2</sub>-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>, 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>) hereafter called IS mixture were all obtained from IsoSciences (Ambler, PA, United States). In order to prepare calibration standards, vitamin D-free serum was purchased from Golden West Diagnostics (Temecula, CA, United States). The following reagents were used for the preparation of mobile phases or samples: acetonitrile (ACN), methanol (MeOH), water (H<sub>2</sub>O), ethyl acetate, and formic acid (FA). The reagents listed above were obtained from VWR (Pennsylvania, United States). A derivatization reaction was carried out using 4-(4'-dimethylaminophenyl)-1,2,4-triazoline-3,5-dione (DAPTAD) synthesized by Masdiag Laboratory (Warsaw, Poland). A

chromatographic separation was performed using a Zorbax Eclipse XDB-C18 (1.8µm, 80Å, 100 × 4.6 mm, Agilent Nacalai Tesque, Santa Clara, United States).

The LC-MS analyses were conducted using a Nexera XR HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan) with an Eksigent autosampler (Sciex, Framingham, MA, United States) coupled with a QTRAP<sup>®</sup> 5500 mass spectrometer (Sciex, Framingham, MA, United States). Analyses were performed in multiple reaction monitoring (MRM) in positive ionization using electrospray source (ESI). These ion source parameters were used: Temperature (TEM) 550°C, Curtain Gas (CUR) 25 psi, IonSpray Voltage (IS) 4000 V, Ion Source Gas 1 (GS1) 40 psi, Ion Source Gas 2 (GS2) 70 psi. H<sub>2</sub>O (phase A) and ACN (phase B), both containing 0.1% formic acid, were used as mobile phases, with a flow rate of 0.6 mL/min. Gradient elution was performed as follows: 0 min - 50% B, 2.5 min - 78% B, 3.2 min - 98% B, 4.5 min - 98% B, 4.6 min - 50% B, 5.5 min - 50% B. Total run time was 5.5 min. The column oven temperature was 45°C.

## 2.4 Free 25-(OH)D levels from vitamin D binding protein analysis

VDBP concentration was measured using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (R&D Systems, MN, United States). The intra-assay CV ranges between 5% and 7%, and the inter-assay CV ranges from 5% to 8%.

Free vitamin D (25-(OH)D<sub>F</sub>) levels were estimated using a published mathematical method (Bikle et al., 1986), with the affinity binding constants for 25-(OH)D<sub>T</sub> with albumin and VDBP being 6 × 10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup> and 7 × 10<sup>8</sup> M<sup>-1</sup>, respectively.

$$\text{Free } 25 - (\text{OH})\text{D} = \frac{\text{total } 25 - (\text{OH})\text{D}}{1 + (6 \times 10^5 \times \text{albumin}) + (7 \times 10^8 \times \text{VDBP})}$$

The levels of bioavailable 25-(OH)D (25-(OH)D<sub>B</sub>) were calculated using equations adapted from Powe et al. (Powe et al., 2011)

$$\text{Bioavailable } 25 - (\text{OH})\text{D} = (1 + (6 \times 10^5) \times \text{albumin}) \times \text{Free } 25 - (\text{OH})\text{D}$$

The concentration of 25-(OH)D<sub>F</sub> and 25-(OH)D<sub>B</sub> were derived from the respective total (sum of D<sub>3</sub> + D<sub>2</sub>) values.

## 2.5 Statistical analysis

The sample size was estimated using the G power 3.1.9.2 calculator (<http://www.gpower.hhu.de/>). Descriptive statistics were presented using mean and standard deviation. The Shapiro-Wilk test assessed data normality, and Levene's test examined homogeneity of variance. Differences between seasons (summer—V1+V2+V3 vs. winter - V4+V5+V6) were assessed using comparison of mixed models with and without seasonal effect, with players id as random effect. VDBP, vitamin D metabolites (25-(OH)D<sub>T</sub>, 25-(OH)D<sub>F</sub>, 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>), VMRs, and psychophysical stress markers were processed with single and population mean cosinor tests to evaluate the presence of a seasonal rhythm. Seasonal rhythm analysis was performed based

TABLE 2 Changes in the levels of the biochemical parameters of football players (n = 20) during the training periods (V1-V6).

	V1	V2	V3	V4	V5	V6	p
VDBP ( $\mu\text{mol/L}$ )	2.65 $\pm$ 0.74	2.66 $\pm$ 0.87	2.97 $\pm$ 0.87	2.28 $\pm$ 0.94	2.13 $\pm$ 0.89	1.42 $\pm$ 1.06	
25-(OH) $D_T$ (ng/mL)	42.0 $\pm$ 6.2	45.0 $\pm$ 5.9	48.6 $\pm$ 7.3	41.8 $\pm$ 5.8	37.9 $\pm$ 6.1	33.7 $\pm$ 4.5	$p_{V1-V3} < 0.001$ , $p_{V1-V6} = 0.002$ , $p_{V2-V3} = 0.017$ , $p_{V2-V4} = 0.022$ , $p_{V2-V5} = 0.003$ , $p_{V2-V6} < 0.001$ , $p_{V3-V4} < 0.001$ , $p_{V3-V5} < 0.001$ , $p_{V3-V6} < 0.001$ , $p_{V4-V6} = 0.002$
25-(OH) $D_F$ (pg/mL)	20.1 $\pm$ 5.9	21.7 $\pm$ 5.6	21.2 $\pm$ 5.1	20.3 $\pm$ 4.6	19.5 $\pm$ 5.3	18.6 $\pm$ 3.9	
25-(OH) $D_B$ (ng/mL)	7.8 $\pm$ 2.3	8.7 $\pm$ 2.4	8.6 $\pm$ 1.9	8.0 $\pm$ 1.9	7.7 $\pm$ 2.0	5.8 $\pm$ 3.3	$p_{V1-V5} < 0.001$ , $p_{V2-V5} < 0.001$ , $p_{V3-V5} < 0.001$ , $p_{V4-V5} < 0.001$
24,25-(OH) $_2D_3$ (ng/mL)	3.8 $\pm$ 0.9	4.3 $\pm$ 0.8	4.6 $\pm$ 1.0	3.8 $\pm$ 0.8	3.2 $\pm$ 0.7	2.8 $\pm$ 0.7	$p_{V1-V2} = 0.031$ , $p_{V1-V3} = 0.003$ , $p_{V1-V6} = 0.017$ , $p_{V2-V3} = 0.028$ , $p_{V1-V5} < 0.001$ , $p_{V1-V6} < 0.001$ , $p_{V3-V4} = 0.016$ , $p_{V3-V5} < 0.001$ , $p_{V3-V6} < 0.001$ , $p_{V4-V5} = 0.02$ , $p_{V4-V6} = 0.01$
3-epi-25-(OH) $D_3$ (ng/mL)	2.0 $\pm$ 0.8	2.1 $\pm$ 0.5	2.3 $\pm$ 0.9	1.8 $\pm$ 0.5	1.6 $\pm$ 0.7	1.3 $\pm$ 0.4	$p_{V3-V6} = 0.038$
25-(OH) $D_3$ :24,25-(OH) $_2D_3$ VMR	11.4 $\pm$ 1.7	10.6 $\pm$ 1.1	10.5 $\pm$ 1.2	11.0 $\pm$ 1.4	11.7 $\pm$ 1.8	12.1 $\pm$ 2.4	$p_{V1-V2} = 0.021$ , $p_{V1-V3} = 0.005$ , $p_{V3-V5} = 0.02$
24,25-(OH) $_2D_3$ :25-(OH) $D_3$ x100 VMR	8.94 $\pm$ 1.43	9.52 $\pm$ 0.95	9.65 $\pm$ 1.12	9.22 $\pm$ 1.18	8.73 $\pm$ 1.32	7.31 $\pm$ 3.40	$p_{V1-V2} = 0.011$ , $p_{V1-V3} = 0.015$ , $p_{V2-V5} = 0.022$ , $p_{V3-V5} = 0.017$
25-(OH) $D_3$ :3-epi-25-(OH) $D_3$ VMR	23.2 $\pm$ 6.7	21.8 $\pm$ 4.3	22.6 $\pm$ 6.7	23.9 $\pm$ 6.6	26.3 $\pm$ 8.4	27.2 $\pm$ 7.7	
Ferritin ( $\mu\text{g/dL}$ )	107.9 $\pm$ 66.4	107.1 $\pm$ 68.0	105.0 $\pm$ 75.3	104.7 $\pm$ 31.3	90.3 $\pm$ 30.3	109.9 $\pm$ 81.4	
AST [U/L]	29.8 $\pm$ 11.9	29.6 $\pm$ 5.3	28.0 $\pm$ 7.5	25.9 $\pm$ 5.3	24.9 $\pm$ 5.1	26.9 $\pm$ 9.4	
ALT [U/L]	25.4 $\pm$ 8.1	24.2 $\pm$ 4.8	25.0 $\pm$ 6.5	21.7 $\pm$ 4.2	23.8 $\pm$ 7.0	21.4 $\pm$ 5.2	
CK [UI/L]	439.4 $\pm$ 241.6	539.6 $\pm$ 771.3	380.7 $\pm$ 246.4	372.2 $\pm$ 186.8	480.4 $\pm$ 537.4	243.9 $\pm$ 97.8	
hs-CRP [mg/L]	3.08 $\pm$ 0.17	3.14 $\pm$ 0.18	3.21 $\pm$ 0.13	3.14 $\pm$ 0.21	3.24 $\pm$ 0.13	3.16 $\pm$ 0.2	
Testosterone [nmol/L]	24.3 $\pm$ 6.0	22.8 $\pm$ 5.2	23.0 $\pm$ 5.6	23.2 $\pm$ 6.7	24.3 $\pm$ 6.0	22.3 $\pm$ 4.6	
Cortisol [nmol/L]	458.5 $\pm$ 71.2	464.4 $\pm$ 80.2	457.7 $\pm$ 64.4	471.9 $\pm$ 69.3	492.1 $\pm$ 72.8	456.1 $\pm$ 90.9	
T/C ratio	0.05 $\pm$ 0.02	0.05 $\pm$ 0.02	0.05 $\pm$ 0.02	0.05 $\pm$ 0.02	0.05 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.02	

VDBP, vitamin D binding protein; AST (aspartate), ALT (alanine)—liver enzymes; CK, creatin kinase; T/C—testosterone to cortisol ratio.

on the midline estimate statistic rhythm (MESOR) (defined as the rhythm-adjusted mean value) using the cosinor-fitting equation,  $y = \text{MESOR} + \text{Amplitude} \times \cos(\text{Frequency}(x) + \text{acrophase})$ , where acrophase is the difference (time) between the MESOR and peak value in the cosine curve. Multiple regression analysis assessed the association between VDBP, 25-(OH) $D_T$ , 25-(OH) $D_F$ , VMR, and psychophysical stress markers, while Pearson's correlation coefficient determined the association between 25-(OH) $D_3$  and vitamin D metabolites. All analyses employed R for Windows, version 4.3.1 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) (Team, 2016). The significance threshold was  $p < 0.05$ .

### 3 Results

The data analysis included results from 20 football players. Changes in biochemical parameter levels during the training periods are shown in Table 2. Significant changes in 25-(OH) $D_T$ , 25-(OH) $D_B$ , 24,25-(OH) $_2D_3$ , 3-epi-25-(OH) $D_3$ , 25-(OH) $D_3$ :24,25-(OH) $_2D_3$ , and 24,25-

(OH) $_2D_3$ :25-(OH) $D_3$  VMR concentrations were demonstrated between the measurements recorded throughout the training period (Table 2). There were no differences in 25-(OH) $D_3$ :3-epi-25-(OH) $D_3$  VMR, ferritin, AST, ALT, CK, hs-CRP, testosterone, cortisol and T/C ratio between training periods in studied athletes.

We also investigated the differences between seasons (summer vs. winter) in VDBP, vitamin D metabolites, VMR and psychophysical stress markers in football players. Table 3 shows changes in the levels of biochemical parameter between studied periods (summer (V1-V3) and winter (V4-V6)). In summer VDBP ( $p = 0.013$ ), 25-(OH) $D_T$  ( $p < 0.001$ ), 25-(OH) $D_B$  ( $p = 0.006$ ), 24,25-(OH) $_2D_3$ , 3-epi-25-(OH) $D_3$  ( $p < 0.001$ ) and 24,25-(OH) $_2D_3$ :25-(OH) $D_3$  ( $p = 0.011$ ) were significantly higher than in winter period. We also observed that during summer (which covered preparatory and competitive training periods) AST ( $p = 0.027$ ) and ALT ( $p = 0.018$ ) were significantly higher than during winter. In winter 25-(OH) $D_3$ :24,25-(OH) $_2D_3$  ( $p = 0.004$ ) and 25-(OH) $D_3$ :3-epi-25-(OH) $D_3$  VMR ( $p = 0.012$ ) were significantly higher than in summer.

**TABLE 3** Changes in the levels of the biochemical parameters of football players (n = 20) between summer and winter period.

	Summer (V1+V2+V3)	Winter (V4+V5+V6)	p
VDBP ( $\mu\text{mol/L}$ )	2.76 $\pm$ 0.15	1.95 $\pm$ 0.37	0.013
25-(OH)D <sub>T</sub> (ng/mL)	45.25 $\pm$ 6.94	38.08 $\pm$ 6.34	<0.001
25-(OH)D <sub>F</sub> (pg/mL)	21.00 $\pm$ 5.45	19.52 $\pm$ 4.61	0.12
25-(OH)D <sub>B</sub> (ng/mL)	8.38 $\pm$ 2.20	7.20 $\pm$ 2.61	0.006
24,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> (ng/mL)	4.21 $\pm$ 0.93	3.32 $\pm$ 0.86	<0.001
3-epi-25-(OH)D <sub>3</sub> (ng/mL)	2.15 $\pm$ 0.76	1.58 $\pm$ 0.58	<0.001
25-(OH)D <sub>3</sub> :24,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> VMR	10.85 $\pm$ 1.40	11.56 $\pm$ 1.86	0.004
24,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> :25-(OH)D <sub>3</sub> x100 VMR	9.37 $\pm$ 1.20	8.47 $\pm$ 2.24	0.011
25-(OH)D <sub>3</sub> :3-epi-25-(OH)D <sub>3</sub> VMR	22.53 $\pm$ 5.89	25.71 $\pm$ 7.53	0.012
Ferritin ( $\mu\text{g/dL}$ )	106.48 $\pm$ 68.58	100.20 $\pm$ 51.32	0.64
AST [U/L]	29.14 $\pm$ 8.53	25.84 $\pm$ 6.66	0.027
ALT [U/L]	24.88 $\pm$ 6.50	22.38 $\pm$ 5.59	0.018
CK [UI/L]	452.98 $\pm$ 478.17	360.22 $\pm$ 330.55	0.23
hs-CRP [mg/L]	3.15 $\pm$ 0.17	3.18 $\pm$ 0.19	0.32
Testosterone [nmol/L]	23.37 $\pm$ 5.55	23.34 $\pm$ 5.85	0.68
Cortisol [nmol/L]	460.25 $\pm$ 70.82	474.56 $\pm$ 77.08	0.24
T/C ratio	0.05 $\pm$ 0.02	0.05 $\pm$ 0.02	0.51

VDBP, vitamin D binding protein; AST (aspartate), ALT (alanine)—liver enzymes; CK, creatin kinase; T/C—testosterone to cortisol ratio.

### 3.1 Mean percent 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> of 25-(OH)D

3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> was detectable in each training period in the entire study cohort. The mean percent 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> of 25-(OH)D was 4.9%, ranging from 1.3% to 4.3% (V1), 4.7% ranging from 1.4% to 3.0% (V2), 4.8% ranging from 1.4% to 4.2% (V3), 4.4% ranging from 1.1% to 3.0% (V4), 4.1% ranging from 0.9% to 3.5% (V5), 3.6% ranging from 0.8% to 2.0% (V6).

### 3.2 Seasonal rhythmicity

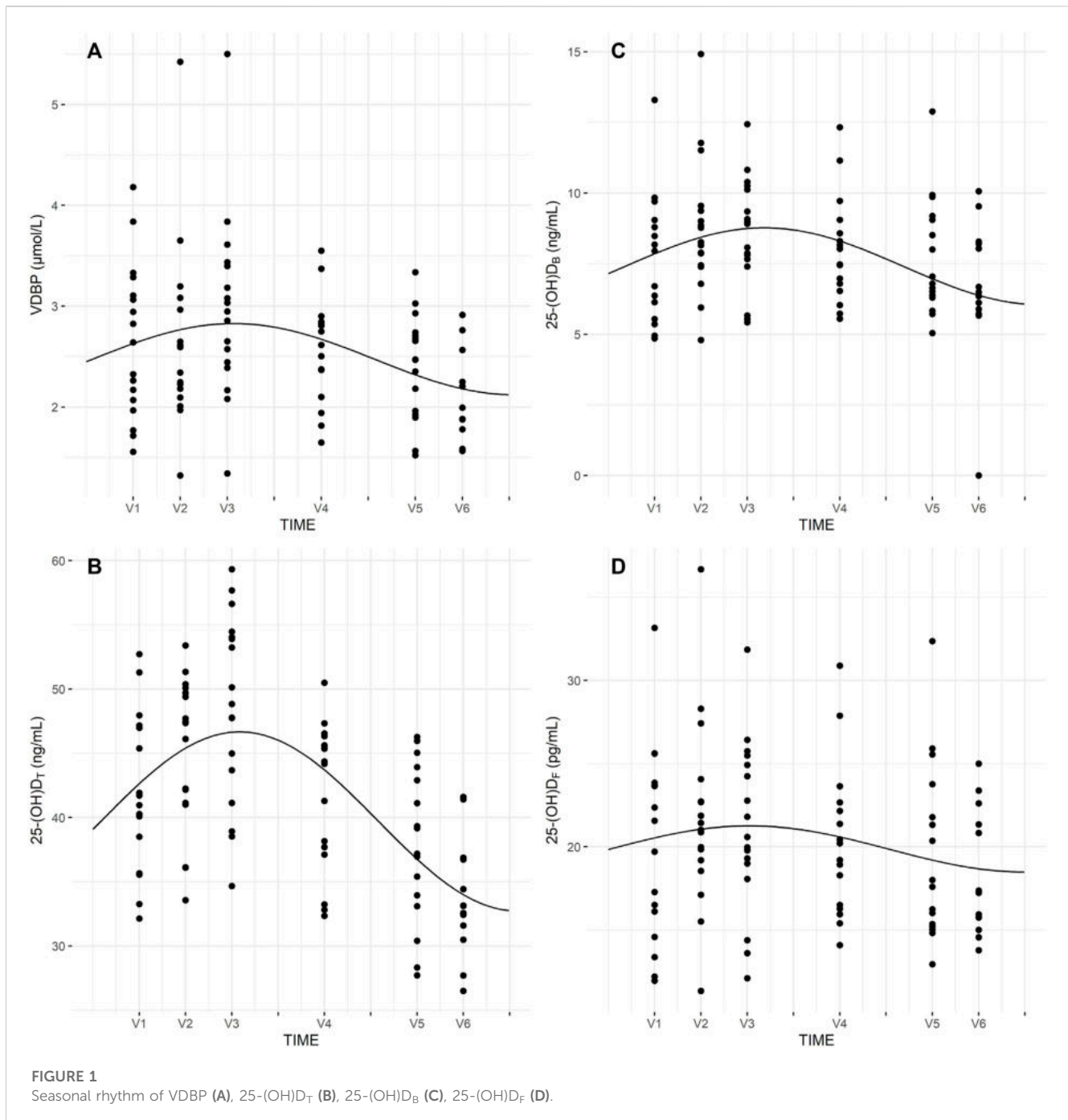
Seasonal rhythm analysis was performed to evaluate training period-related fluctuation in VDBP, vitamin D metabolites (25-(OH)D<sub>T</sub>, 25-(OH)D<sub>F</sub>, 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>), VMRs, and psychophysical stress markers. Cosinor curves (Figure 1, Figure 2) showed significant seasonal rhythm for VDBP ( $p = 0.003$ ), 25-(OH)D<sub>T</sub>, 25-(OH)D<sub>B</sub>, 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>, 25-(OH)D<sub>3</sub>:24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> VMR ( $p < 0.001$ ), and 25-(OH)D<sub>3</sub>:3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> VMR ( $p = 0.007$ ). No significant rhythm was observed for 25-(OH)D<sub>F</sub> and all psychophysical stress markers (ferritin, liver enzymes, CK, testosterone, cortisol, and T/C ratio). Table 4 shows the rhythmometric parameters of vitamin D metabolites and ratios.

### 3.3 VDBP, 25-(OH)D<sub>F</sub>, vitamin D metabolites, VMRs and psychophysical stress markers

Multiple regression analysis was performed to analyze the association between VDBP, 25-(OH)D<sub>T</sub>, 25-(OH)D<sub>B</sub>, 25-(OH)D<sub>F</sub>, vitamin D metabolites, VMRs, and psychophysical stress markers. However, no correlation was detected between VDBP, 25-(OH)D<sub>T</sub>, 25-(OH)D<sub>B</sub>, 25-(OH)D<sub>F</sub>, 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>, 25-(OH)D<sub>3</sub>:24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 25-(OH)D<sub>3</sub>:24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 25-(OH)D<sub>3</sub>:3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>, ferritin, liver enzymes (AST, ALT), CK, cortisol, testosterone, and T/C ratio in each period (V1-V6).

### 3.4 25-(OH)D<sub>3</sub>, 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>

Pearson's correlation coefficient was calculated to define the association between 25-(OH)D<sub>3</sub> and vitamin D metabolites during different training periods. Table 5 shows the relationship between 25-(OH)D<sub>3</sub> and vitamin D metabolites. There was a strong statistically significant association between 25-(OH)D<sub>3</sub> and 24,25-(OH)D<sub>3</sub> in each training period (V1-V4:  $p < 0.001$ ; V5:  $p < 0.01$ ; V6:  $p < 0.01$ ). The association between 25-(OH)D<sub>3</sub> and 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> was observed only after the pre-season period (V2:  $p < 0.01$ ) (Table 5).



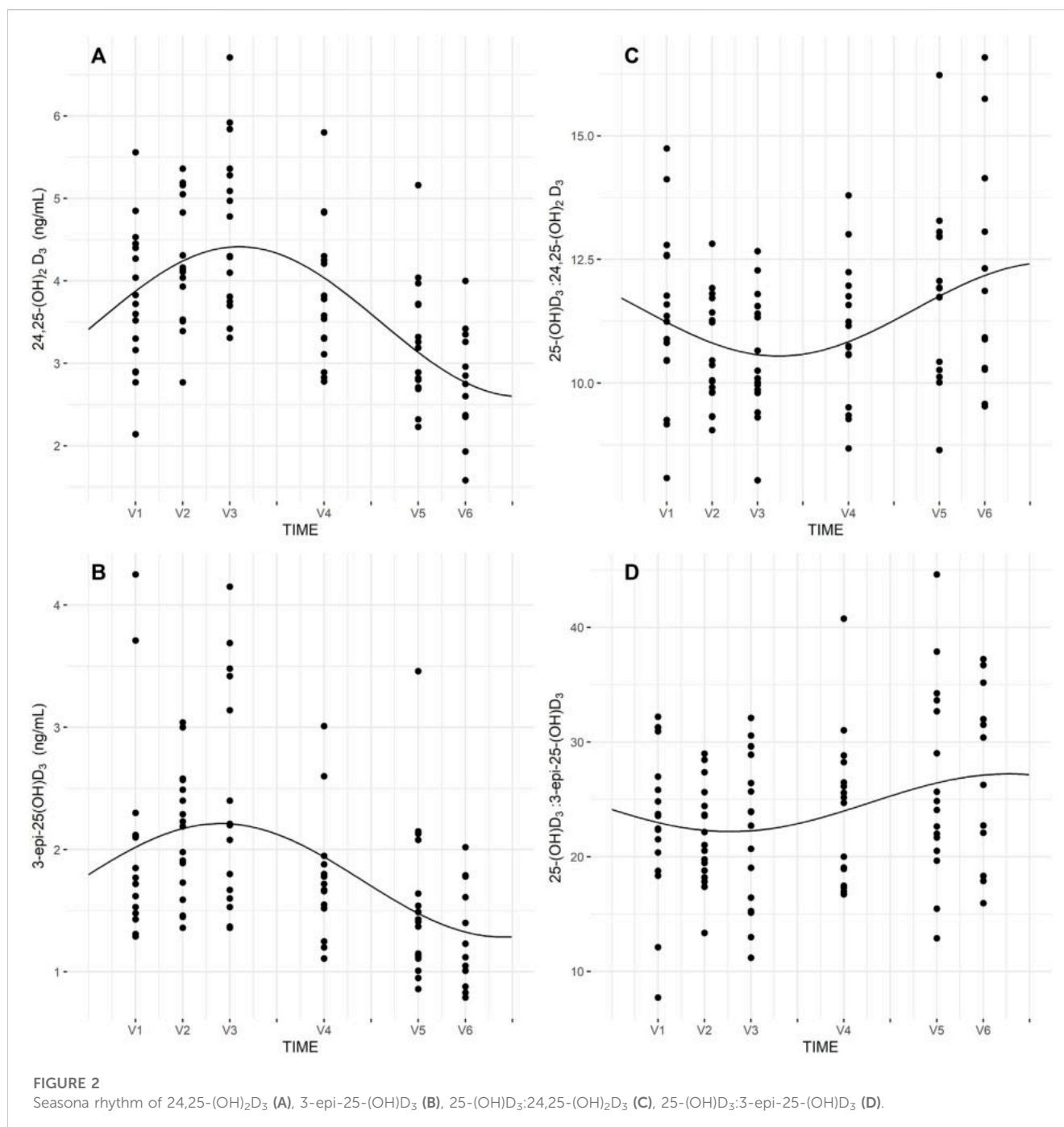
## 4 Discussion

This is the first study to examine seasonal changes in vitamin D metabolites, VMRs, and markers of psychophysical stress in male football players.

We found significant seasonal rhythms for VDBP, 25-(OH)D<sub>T</sub>, and 25-(OH)D<sub>B</sub>. Similarly, Vitale et al. (Vitale et al., 2018), observed a significant circannual rhythm in 25-(OH)D<sub>T</sub> concentrations in male and female professional skiers. The higher vitamin D concentrations appeared in July, with the rhythm-adjusted mean and amplitude comparable between the two groups. Lombardi et al. (Lombardi et al., 2017) evaluated vitamin D, CK, testosterone, and

cortisol in three professional football teams to investigate circannual rhythms. The authors documented statistically significant circannual rhythms for 25-(OH)D<sub>T</sub>, cortisol, testosterone and T/C ratio. In contrast, the current study found no seasonal rhythm for these psychophysical stress markers.

Our results indicated significant seasonal rhythms in 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>, 25-(OH)D<sub>3</sub>:24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, and 25-(OH)D<sub>3</sub>:3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> ratios. Tang et al. (Tang et al., 2019) conducted research on 940 young and healthy United Kingdom army recruits and found circannual rhythms for all vitamin D metabolites (25-(OH)D, 24,25-(OH)<sub>2</sub>D) and VMRs (25-(OH)D:24,25-(OH)<sub>2</sub>D, 1,25-(OH)<sub>2</sub>D:24,25-(OH)<sub>2</sub>D),



except for 1,25-(OH)<sub>2</sub>D, when fitted to cosinor curves. Our cohort of professional football players showed similar trends. Indeed, 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> and 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> had a propensity to fluctuate with 25-(OH)D<sub>T</sub>, with changes between summer and winter periods. Furthermore, 25-(OH)D<sub>3</sub>:24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and 25-(OH)D<sub>3</sub>:3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> VMRs were less susceptible to seasonal fluctuation. It should be noted that sunlight exposure is one of the major factor, which influences on vitamin D metabolites levels, especially in countries situated at latitude above 40°. Therefore, the results of this study show that higher concentration of vitamin D metabolites (25-(OH)D<sub>T</sub>, 25-(OH)D<sub>B</sub>, 25-(OH)D<sub>F</sub>, 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>) occurred in

summer time (July, August) compare to fall or winter months. Other factors, which may affecting on vitamin D metabolite levels is dietary intake of vitamin D or use of supplements.

The primary aim of athletes training is to supply stimulation that disrupts homeostasis to bring about adaptive responses that enhance physical performance. Therefore, maximizing the training stimulus is a key rule of athletic training. On the other hand, the ability to recover fast is crucial so that competitors can perform at high intensities more frequently. Human skeletal muscle counters to training stimuli and/or tissue damage through remodeling (Dahlquist et al., 2015). Some recent studies suggest that vitamin D might play an important role in skeletal muscle repair and

**TABLE 4 Rhythmic analysis of VDBP, vitamin D metabolites and ratios of football players.**

	PR [%]	p-value	MESOR [mean and 95% CI]	Amplitude [mean and 95% CI]	Acrophase [mean and 95% CI]
VDBP (μmol/L)	94	0.003	2.47 [2.30–2.65]	0.35 [0.09–0.62]	–1.50 [–2.19 to –0.81]
25-(OH)D <sub>T</sub> [ng/mL]	35.3	<0.001	39.70 [38.20–41.19]	6.97 [4.66–9.28]	–1.48 [–1.79 to –1.18]
25-(OH)D <sub>B</sub> [ng/mL]	11.6	<0.001	7.41 [6.85–7.96]	1.36 [0.46–2.26]	–1.38 [–1.93 to –0.82]
25-(OH)D <sub>F</sub> [pg/mL]	32	0.082	19.87 [18.61–21.12]	1.39 [–0.48–3.26]	–1.55 [–2.85 to –0.24]
24,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> [ng/mL]	32.5	<0.001	3.50 [3.30–3.71]	0.91 [0.59–1.23]	–1.47 [–1.78 to –1.16]
3-epi-25-(OH)D <sub>3</sub> [ng/mL]	19.6	<0.001	1.75 [1.59–1.91]	0.46 [0.24–0.69]	1.47 [0.93–2.01]
25(OH)D <sub>3</sub> :24,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	10.7	0.001	11.49 [11.11–11.88]	0.95 [0.30–1.59]	–1.33 [–1.85 to –0.81]
25(OH)D <sub>3</sub> :3-epi-25(OH)D <sub>3</sub>	7.5	0.007	24.70 [23.07–26.34]	2.51 [0.41–4.62]	1.34 [0.27–2.40]

PR: percentage of rhythm. MESOR: Midline Estimating Statistic of Rhythm. Amplitude: half the difference between the highest and the lowest points of the cosine function best fitting the data. Acrophase indicates the time in which the highest values occur.

**TABLE 5 Correlations between 25-(OH)D<sub>3</sub> and vitamin D metabolites in each training period.**

Vitamin D metabolites	25(OH)D <sub>3</sub> (ng/mL)					
	V1	V2	V3	V4	V5	V6
	R					
24,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> (ng/mL)	0.75 <sup>b</sup>	0.85 <sup>b</sup>	0.83 <sup>b</sup>	0.81 <sup>b</sup>	0.69 <sup>a</sup>	0.74 <sup>a</sup>
3-epi-25(OH)D <sub>3</sub> (ng/mL)	–0.02	0.63 <sup>a</sup>	0.46	0.43	0.48	0.28

<sup>a</sup>p < 0.01.

<sup>b</sup>p < 0.001.

remodeling (Owens et al., 2018), and others have reported on the relationship between 25-(OH)D<sub>T</sub> muscle damage biomarkers, and overtraining symptoms. The results of these studies found no relationship between 25-(OH)D<sub>T</sub> and ferritin (Jastrzebska et al., 2017) or CK (Lombardi et al., 2017; Ferrari et al., 2020) in athletes from different sports disciplines. Based on the free hormone hypothesis, some vitamin D functions may be closely linked to its free fraction than total serum 25-(OH)D concentrations (Powe et al., 2011; Shieh et al., 2016). Hence, we examined whether 25-(OH)D<sub>F</sub> was associated better with psychophysical stress markers than 25-(OH)D<sub>T</sub>. However, we documented no significant association of 25-(OH)D fractions (total and free) with psychophysical stress markers in football players in each training period.

Testosterone is the principal male sex hormone and stimulates anabolic metabolism, causing an increase in muscle and skeletal system volume, strength, and endurance. Moreover, testosterone facilitates muscular adaptations to exercise and improves their recovery ability. Male reproductive physiology is influenced by 25-(OH)D (Crewther et al., 2011), with VDRs and vitamin D metabolizing enzymes expressed in Leydig cells (Jensen, 2012; Boisen et al., 2017), suggesting a direct role for vitamin D in steroidogenesis regulation. Based on this evidence, vitamin D may have a role in regulating testosterone levels. However, we found no correlation between 25-(OH)D<sub>T</sub>, 25-(OH)D<sub>F</sub>, and testosterone concentration in football players, which is in line with our previous study (Książek et al., 2021) in young, healthy men.

Krzywański et al. (Krzywański et al., 2020) also evaluated the relationship between plasma 25-(OH)D<sub>T</sub> and testosterone concentrations in professional track and field athletes. Similar to the current study, they found no significant correlation between 25-(OH)D<sub>T</sub> and testosterone concentrations in male and female athletes, from strength or endurance disciplines, in any season. Crewther et al. (Crewther et al., 2020) assessed the interplay between 25-(OH)D<sub>T</sub>, cortisol, and testosterone and their effects on exercise performance in 88 male ice hockey players (<20 years), with no correlation evident between vitamin D and both hormones. Other studies also demonstrated no relationship between 25-(OH)D<sub>T</sub> and cortisol and testosterone concentration in elite soccer players (Lombardi et al., 2017; Ferrari et al., 2020) and ice hockey players (Fitzgerald et al., 2018).

The effects of a single exercise on vitamin D (Sun et al., 2017; Dzik et al., 2022) and its metabolites (Mieszkowski et al., 2020) have been documented. However, there are no such data on the effects of varied training loads over different training periods on the vitamin D metabolome. Therefore, we explored the relationship between 25-(OH)D<sub>3</sub>, 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, and 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> in each training period, and found that 25-(OH)D<sub>3</sub> correlated strongly with 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in all periods. Although 24,25-(OH)<sub>2</sub>D and 3-epi-25-(OH)D are deemed to be biologically inactive metabolites, studies in animal models indicated that 24,25-(OH)<sub>2</sub>D exerts a pivotal role in maintaining bone integrity, function, and healing (Seo et al., 1997; Seo and Norman, 1997). Moreover, 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> levels are directly connected with the cardiovascular risk profile, and 3-epi-1α,25(OH)<sub>2</sub>D, a derivative of 3-epi-25-(OH)D, successfully decrease blood PTH without affecting Ca levels (Brown et al., 2005; Lutsey et al., 2015). The biological function of 24,25-(OH)<sub>2</sub>D and 3-epi-25-(OH)D is not well understood. Therefore, studying the effects of vitamin D metabolite actions on skeletal muscle function in athletes is vital.

This study had strengths and limitations. One of the study's strengths is the homogeneity of the cohort and the athletes having similar training loads/volumes. In addition, vitamin D metabolites were measured using gold-standard methods. The main limitation of this study was that the data collection period covered only half of the year instead of the whole year. Also, a greater number of participants would have increased the power of statistical

analysis. Nevertheless, football teams usually have no more than 25 players. Moreover, we assessed 25-(OH) $D_F$  concentrations using a calculated method rather than directly measuring free vitamin D metabolite levels. Nonetheless, findings emerging from various studies indicate that VMRs, particularly the 24,25-(OH) $_2D$ -to-25-(OH)D ratio (i.e., the ratio indicating how much precursor could be converted into the bioactive form), may better represent the vitamin D status than 25-(OH)D alone since it considers the different metabolic fates. Specifically, the ratio of 24,25-(OH) $_2D$ :25-(OH)D should range between 4% and 12%, which reflects correct vitamin D status regardless of the absolute 25-(OH)D level (Alonso et al., 2022).

## 5 Conclusion

In conclusion, a seasonal rhythm was present for VDBP, 25-(OH) $D_T$ , 25-(OH) $D_B$ , vitamin D metabolites (24,25-(OH) $_2D_3$ , 3-epi-25-(OH) $D_3$ ), and VMRs (25-(OH) $D_3$ :24,25-(OH) $_2D_3$ , 25-(OH) $D_3$ :3-epi-25-(OH) $D_3$ ), though none was detected for 25-(OH) $D_F$  or psychophysical stress markers (ferritin, liver enzymes, CK, testosterone, cortisol, and T/C ratio). Furthermore, no correlation was observed between total or free 25-(OH)D, VMRs, or psychophysical stress markers. As such, the association between free and total 25-(OH)D and psychophysical stress markers do not demonstrate the superiority of free measurements over total measurements. The results of the present study did not provide evidence that 25-(OH) $D_T$  and 25-(OH) $D_F$  influence testosterone concentration in football players during different training periods. Moreover, training loads in different training periods did not affect resting vitamin D metabolite concentrations.

## Data availability statement

The raw data supporting the conclusion of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

## Ethics statement

The studies involving humans were approved by Wrocław University of Health and Sport Sciences Ethical Committee

## References

- Alonso, N., Zelzer, S., Eibinger, G., and Herrmann, M. (2022). Vitamin D metabolites: analytical challenges and clinical relevance. *Calcif. Tissue Int.* 112, 158–177. doi:10.1007/s00223-022-00961-5
- Berg, A. H., Powe, C. E., Evans, M. K., Wenger, J., Ortiz, G., Zonderman, A. B., et al. (2015). 24,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and vitamin D status of community-dwelling black and white Americans. *Clin. Chem.* 61 (6), 877–884. doi:10.1373/clinchem.2015.240051
- Bikle, D. D., Gee, E., Halloran, B., Kowalski, M. A., Ryzan, E., and Haddad, J. G. (1986). Assessment of the free fraction of 25-hydroxyvitamin D in serum and its regulation by albumin and the vitamin D-binding protein. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 63 (4), 954–959. doi:10.1210/jcem-63-4-954
- Bikle, D. D. (2021). The free hormone hypothesis: when, why, and how to measure the free hormone levels to assess vitamin D, thyroid, sex hormone, and cortisol status. *JBM Plus* 5 (1), e10418. doi:10.1002/jbm4.10418
- Boisen, I. M., Hansen, L. B., Mortensen, L. J., Lanske, B., Juul, A., and Jensen, M. B. (2017). Possible influence of vitamin D on male reproduction. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 173, 215–222. doi:10.1016/j.jsbmb.2016.09.023
- Bosworth, C. R., Levin, G., Robinson-Cohen, C., Hoofnagle, A. N., Ruzinski, J., Young, B., et al. (2012). The serum 24,25-dihydroxyvitamin D concentration, a marker of vitamin D catabolism, is reduced in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 82 (6), 693–700. doi:10.1038/ki.2012.193
- Bouillon, R., Schuit, F., Antonio, L., and Rastinejad, F. (2019). Vitamin D binding protein: a historic overview. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 10, 910. doi:10.3389/fendo.2019.00910
- Brown, A. J., Ritter, C. S., Weiskopf, A. S., Vouros, P., Sasso, G. J., Uskokovic, M. R., et al. (2005). Isolation and identification of 1 $\alpha$ -hydroxy-3-epi-vitamin D<sub>3</sub>, a potent suppressor of parathyroid hormone secretion. *J. Cell. Biochem.* 96 (3), 569–578. doi:10.1002/jcb.20553
- Caballero-García, A., Córdova-Martínez, A., Vicente-Salar, N., Roche, E., and Pérez-Valdecantos, D. (2021). Vitamin D, its role in recovery after muscular damage following exercise. *Nutrients* 13 (7), 2336. doi:10.3390/nu13072336
- Cashman, K. D., Hayes, A., Galvin, K., Merkel, J., Jones, G., Kaufmann, M., et al. (2015). Significance of serum 24,25-dihydroxyvitamin D in the assessment of vitamin D

(resolution number 18/2013). The studies were conducted in accordance with the local legislation and institutional requirements. The participants provided their written informed consent to participate in this study.

## Author contributions

AK: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Writing—original draft. AZ: Conceptualization, Data curation, Investigation, Methodology, Writing—review and editing. GL: Conceptualization, Methodology, Writing—review and editing. MS-L: Conceptualization, Methodology, Writing—review and editing.

## Funding

The author(s) declare financial support was received for the research, authorship, and/or publication of this article. This research was supported financially by the Wrocław University of Health and Sport Sciences, Poland.

## Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

The author(s) declared that they were an editorial board member of Frontiers, at the time of submission. This had no impact on the peer review process and the final decision.

## Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.



- status: a double-edged sword? *Clin. Chem.* 61 (4), 636–645. doi:10.1373/clinchem.2014.234955
- Chun, R. F., Peercy, B. E., Orwoll, E. S., Nielson, C. M., Adams, J. S., and Hewison, M. (2014). Vitamin D and DBP: the free hormone hypothesis revisited *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 144, Pt A:132–7. doi:10.1016/j.jsbmb.2013.09.012
- Crewther, B., Cook, C., Fitzgerald, J., Starczewski, M., Gorski, M., and Orysiak, J. (2020). Vitamin D and cortisol as moderators of the relationship between testosterone and exercise performance in adolescent male athletes. *Pediatr. Exerc. Sci.* 32 (4), 204–209. doi:10.1123/pes.2019-0229
- Crewther, B. T., Cook, C., Cardinale, M., Weatherby, R. P., and Lowe, T. (2011). Two emerging concepts for elite athletes: the short-term effects of testosterone and cortisol on the neuromuscular system and the dose-response training role of these endogenous hormones. *Sports Med.* 41 (2), 103–123. doi:10.2165/11539170-000000000-00000
- Dahlquist, D. T., Dieter, B. P., and Koehle, M. S. (2015). Plausible ergogenic effects of vitamin D on athletic performance and recovery. *J. Int. Soc. Sports Nutr.* 12, 33. doi:10.1186/s12970-015-0093-8
- Dzik, K. P., Grzywacz, T., Łuszczczyk, M., Kujach, S., Flis, D. J., and Kaczor, J. J. (2022). Single bout of exercise triggers the increase of vitamin D blood concentration in adolescent trained boys: a pilot study. *Sci. Rep.* 12 (1), 1825. doi:10.1038/s41598-022-05783-x
- Dzik, K. P., and Kaczor, J. J. (2019). Mechanisms of vitamin D on skeletal muscle function: oxidative stress, energy metabolism and anabolic state. *Eur. J. Appl. Physiol.* 119 (4), 825–839. doi:10.1007/s00421-019-04104-x
- Farrokhyar, F., Tabasinejad, R., Dao, D., Peterson, D., Ayeni, O. R., Hadioonazadeh, R., et al. (2015). Prevalence of vitamin D inadequacy in athletes: a systematic-review and meta-analysis. *Sports Med.* 45 (3), 365–378. doi:10.1007/s40279-014-0267-6
- Ferrari, D., Lombardi, G., Strollo, M., Pontillo, M., Motta, A., and Locatelli, M. (2020). A possible antioxidant role for vitamin D in soccer players: a retrospective analysis of psychophysical stress markers in a professional team. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 17 (10), 3484. doi:10.3390/ijerph17103484
- Fitzgerald, J. S., Orysiak, J., Wilson, P. B., Mazur-Różycka, J., and Obminski, Z. (2018). Association between vitamin D status and testosterone and cortisol in ice hockey players. *Biol. Sport* 35 (3), 207–213. doi:10.5114/biolSport.2018.74631
- Ginsberg, C., Hoofnagle, A. N., Katz, R., Becker, J. O., Kritchevsky, S. B., Shlipak, M. G., et al. (2020). The vitamin D metabolite ratio is independent of vitamin D binding protein concentration. *Clin. Chem.* 67 (2), 385–393. doi:10.1093/clinchem/hvaa238
- Ginsberg, C., Katz, R., de Boer, I. H., Kestenbaum, B. R., Chonchol, M., Shlipak, M. G., et al. (2018). The 24,25 to 25-hydroxyvitamin D ratio and fracture risk in older adults: the cardiovascular health study. *Bone* 107, 124–130. doi:10.1016/j.bone.2017.11.011
- Harju, T., Gray, B., Mavroedi, A., Farooq, A., and Reilly, J. J. (2022). Prevalence and novel risk factors for vitamin D insufficiency in elite athletes: systematic review and meta-analysis. *Eur. J. Nutr.* 61 (8), 3857–3871. doi:10.1007/s00394-022-02967-z
- Harris, D. J., MacSween, A., and Atkinson, G. (2019). Ethical standards in sport and exercise science research: 2020 update. *Int. J. Sports Med.* 40 (13), 813–817. doi:10.1055/a-1015-3123
- Herrmann, M., Farrell, C. L., Pusccheddu, I., Fabregat-Cabello, N., and Cavalier, E. (2017). Assessment of vitamin D status - a changing landscape. *Clin. Chem. Lab. Med.* 55 (1), 3–26. doi:10.1515/cclm-2016-0264
- Jastrzebska, M., Kaczmarczyk, M., Suárez, A. D., Sánchez, G. F. L., Jastrzebska, J., Radzimiński, L., et al. (2017). Iron, hematological parameters and blood plasma lipid profile in vitamin D supplemented and non-supplemented young soccer players subjected to high-intensity interval training. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* 63 (6), 357–364. doi:10.3177/jnsv.63.357
- Jensen, M. B. (2012). Vitamin D metabolism, sex hormones and male reproductive function. *Reprod. REP-12-0064*. doi:10.1530/REP-12-0064
- Krzywański, J., Pokrywka, A., Młyniczak, M., and Mikulski, T. (2020). Is vitamin D status reflected by testosterone concentration in elite athletes? *Biol. Sport* 37 (3), 229–237. doi:10.5114/biolSport.2020.95633
- Książek, A., Mędraś, M., Zagrodna, A., Słowińska-Lisowska, M., and Lwow, F. (2021). Correlative studies on vitamin D and total, free bioavailable testosterone levels in young, healthy men. *Sci. Rep.* 11 (1), 20198. doi:10.1038/s41598-021-99571-8
- Książek, A., Zagrodna, A., Słowińska-Lisowska, M., and Lombardi, G. (2022). Relationship between metabolites of vitamin D, free 25-(OH)D, and physical performance in indoor and outdoor athletes. *Front. Physiol.* 13, 909086. doi:10.3389/fphys.2022.909086
- Latham, C. M., Brightwell, C. R., Keeble, A. R., Munson, B. D., Thomas, N. T., Zagzoog, A. M., et al. (2021). Vitamin D promotes skeletal muscle regeneration and mitochondrial health. *Front. Physiology* 12, 660498. doi:10.3389/fphys.2021.660498
- Lombardi, G., Vitale, J. A., Logoluso, S., Logoluso, G., Cocco, N., Cocco, G., et al. (2017). Circannual rhythm of plasmatic vitamin D levels and the association with markers of psychophysical stress in a cohort of Italian professional soccer players. *Chronobiol. Int.* 34 (4), 471–479. doi:10.1080/07420528.2017.1297820
- Lutsey, P. L., Eckfeldt, J. H., Ogagarue, E. R., Folsom, A. R., Michos, E. D., and Gross, M. (2015). The 25-hydroxyvitamin D3 C-3 epimer: distribution, correlates, and reclassification of 25-hydroxyvitamin D status in the population-based Atherosclerosis Risk in Communities Study (ARIC). *Clin. Chim. Acta* 442, 75–81. doi:10.1016/j.cca.2014.12.036
- Martens, P. J., Gysemans, C., Verstuyf, A., and Mathieu, A. C. (2020). Vitamin D's Effect on Immune Function. *Nutrients* 12 (5), 1248. doi:10.3390/nu12051248
- Messa, P., Curreri, M., Regalia, A., and Alfieri, C. M. (2014). Vitamin D and the cardiovascular system: an overview of the recent literature. *Am J. Cardiovasc. Drugs* 14 (1), 1–14. doi:10.1007/s40256-013-0047-y
- Mieszkowski, J., Stankiewicz, B., Kochanowicz, A., Niespodziński, B., Kowalik, T., Żmijewski, M., et al. (2020). Ultra-marathon-induced increase in serum levels of vitamin D metabolites: a double-blind randomized controlled trial. *Nutrients* 12 (12), 3629. doi:10.3390/nu12123629
- Owens, D. J., Allison, R., and Close, G. L. (2018). Vitamin D and the athlete: current perspectives and new challenges. *Sports Med.* 48 (1), 3–16. doi:10.1007/s40279-017-0841-9
- Powe, C. E., Ricciardi, C., Berg, A. H., Erdenesanaa, D., Collerone, G., Ankers, E., et al. (2011). Vitamin D-binding protein modifies the vitamin D-bone mineral density relationship. *J. Bone Min. Res.* 26 (7), 1609–1616. doi:10.1002/jbmr.387
- Puangthong, C., Sukhong, P., Saengnual, P., Sriksuea, R., and Chanda, M. (2021). A single bout of high-intensity exercise modulates the expression of vitamin D receptor and vitamin D-metabolising enzymes in horse skeletal muscle. *Equine Vet. J.* 53 (4), 796–805. doi:10.1111/evj.13346
- Ribbans, W. J., Aujla, R., Dalton, S., and Nunley, J. A. (2021). Vitamin D and the athlete-patient: state of the art. *J. isakos* 6 (1), 46–60. doi:10.1136/jisakos-2020-000435
- Rola, R., Kowalski, K., Bierkowski, T., and Studzińska, S. (2020). Improved sample preparation method for fast LC-MS/MS analysis of vitamin D metabolites in serum. *J. Pharm. Biomed. Analysis* 190, 113529. doi:10.1016/j.jpba.2020.113529
- Seo, E. G., Einhorn, T. A., and Norman, A. W. (1997). 24R,25-dihydroxyvitamin D3: an essential vitamin D3 metabolite for both normal bone integrity and healing of tibial fracture in chicks. *Endocrinology* 138 (9), 3864–3872. doi:10.1210/endo.138.9.5398
- Seo, E. G., and Norman, A. W. (1997). Three-fold induction of renal 25-hydroxyvitamin D3-24-hydroxylase activity and increased serum 24,25-dihydroxyvitamin D3 levels are correlated with the healing process after chick tibial fracture. *J. Bone Min. Res.* 12 (4), 598–606. doi:10.1359/jbmr.1997.12.4.598
- Shieh, A., Chun, R. F., Ma, C., Witzel, S., Meyer, B., Rafison, B., et al. (2016). Effects of high-dose vitamin D2 versus D3 on total and free 25-hydroxyvitamin D and markers of calcium balance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 101 (8), 3070–3078. doi:10.1210/jc.2016-1871
- Shieh, A., Ma, C., Chun, R. F., Wittwer-Schegg, J., Swinkels, L., Huijs, T., et al. (2018). Associations between change in total and free 25-hydroxyvitamin D with 24,25-dihydroxyvitamin D and parathyroid hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metabolism* 103 (9), 3368–3375. doi:10.1210/jc.2018-00515
- Sriksuea, R., Zhang, X., Park-Sarge, O. K., and Esser, K. A. (2012). VDR and CYP27B1 are expressed in C2C12 cells and regenerating skeletal muscle: potential role in suppression of myoblast proliferation. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 303 (4), C396–C405. doi:10.1152/ajpcell.00014.2012
- Sriksuea, R., Hirunsai, M., and Charoenphandhu, N. (2020). Regulation of vitamin D system in skeletal muscle and resident myogenic stem cell during development, maturation, and ageing. *Sci. Rep.* 10 (1), 8239. doi:10.1038/s41598-020-65067-0
- Sun, X., Cao, Z. B., Taniguchi, H., Tanisawa, K., and Higuchi, M. (2017). Effect of an acute bout of endurance exercise on serum 25(OH)D concentrations in young adults. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 102 (11), 3937–3944. doi:10.1210/jc.2017-00146
- Tang, J. C. Y., Jackson, S., Walsh, N. P., Greeves, J., Fraser, W. D., Ball, N., et al. (2019). The dynamic relationships between the active and catabolic vitamin D metabolites, their ratios, and associations with PTH. *Sci. Rep.* 9 (1), 6974. doi:10.1038/s41598-019-43462-6
- Team, R. C. (2016). *R: a language and environment for statistical computing [Computer software]*. Vienna, Austria: R foundation for statistical computing.
- Vitale, J. A., Lombardi, G., Cavaleri, L., Graziani, R., Schoenhuber, H., Torre, A., et al. (2018). Rates of insufficiency and deficiency of vitamin D levels in elite professional male and female skiers: a chronobiologic approach. *Chronobiol. Int.* 35 (4), 441–449. doi:10.1080/07420528.2017.1410828



PODPIS ZAUFANY

ANNA  
KSIĄŻEK

14.12.2023 18:32:30 [GMT+1]

Dokument podpisany elektronicznie  
podpisem zaufanym

**Umowa nr PN/BK/M/2020/04**  
**o realizację projektu – działania naukowego**  
wybranego do dofinansowania w konkursie ogłoszonym przez Radę Kolegium Naukowego

zawarta w dniu 12.10.2020 r. we Wrocławiu pomiędzy:

Akademią Wychowania Fizycznego we Wrocławiu, 51-612 Wrocław, al. Ignacego Jana Paderewskiego 35, zwanym dalej „AWF”, reprezentowaną przez :

1. prof. dr hab. Małgorzatę Słowińską-Lisowską – Prorektora ds. Nauki i Współpracy z Zagranicą,
2. prof. dra hab. Marka Woźniewskiego – Przewodniczącego Kolegium Naukowego,
3. przy kontrasygnacie Głównego Księgowego – Kwestora mgr inż. Zofię Tarnowską

a

Panią Anną Książek, dr (*imię, nazwisko, tytuł/stopień naukowy*), pracownicą AWF, zwaną dalej “Osobą realizującą projekt”.

**§ 1**

**Przedmiot umowy**

Umowa określa warunki realizacji, finansowania oraz rozliczenia projektu - działania naukowego pt. *Białko wiążące witaminę D a wybrane zdolności wysiłkowe u sportowców* zarejestrowanego pod numerem PN/BK/M?2020/04, zwanego dalej „Projektem”, szczegółowo opisanego we wniosku o finansowanie pojedynczego działania naukowego, zwanym dalej „Wnioskiem”, stanowiącym Załącznik nr 1 do niniejszej umowy.

**§ 2**

**Warunki realizacji Projektu**

1. Projekt realizowany będzie w okresie od dnia 12.10.2020 do dnia 31.12.2021.
2. Realizacja Projektu obejmuje wykonanie pełnego zakresu rzeczowego Projektu zgodnie z Wnioskiem i udokumentowanie poniesionych wydatków.
3. Projekt zostanie sfinansowany w kwocie 11 900 zł ze środków subwencji otrzymanej od Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego.
4. Wydatki poniesione poza okresem realizacji Projektu określonym w ust. 1, będą uznane za wydatki niekwalifikowalne.
5. Osoba realizująca projekt oświadcza, że zadania objęte Projektem nie będą finansowane ze środków pochodzących z innych źródeł.

**§ 3**

**Wydatki kwalifikowalne**

1. Wydatkiem kwalifikowalnym jest wydatek spełniający łącznie następujące warunki:
  - a) został faktycznie poniesiony w okresie wskazanym w §2 ust. 1 niniejszej umowy,
  - b) jest zgodny z obowiązującymi przepisami prawa, w tym regulacjami obowiązującymi w AWF,
  - c) został poniesiony zgodnie z postanowieniami umowy,
  - d) został uwzględniony w kosztorysie projektu badawczego zawartym we wniosku o finansowanie wewnętrznego projektu badawczego, stanowiącym Załącznik nr 1 do niniejszej umowy,

- e) jest niezbędny do realizacji Projektu i został poniesiony w związku z realizacją Projektu,
- f) jest możliwy do zidentyfikowania i zweryfikowania, oraz został rzetelnie udokumentowany,
- g) został wykazany w sprawozdaniu,
- h) został poniesiony zgodnie z przepisami ustawy *Prawo zamówień publicznych*.

#### § 4

##### Prawa i obowiązki stron

1. Osoba realizująca projekty zobowiązuje się do realizacji swoich zadań zgodnie z Wytycznymi dot. realizacji projektu – działania naukowego wyłonionego w Konkursie ogłoszonym przez Radę Kolegium Naukowego, zwanymi dalej Wytycznymi, w szczególności:
  - a) Osoba realizująca projekt zobowiązuje się dochować najwyższej staranności przy realizacji Projektu i wykonywać go zgodnie z przepisami prawa oraz wewnętrznymi regulacjami obowiązującymi w AWF i ponosi odpowiedzialność za wszelkie szkody powstałe w trakcie realizacji Projektu w wyniku własnych zaniedbań bądź zaniechań, albo zaniedbań bądź zaniechań osób, którym powierza wykonanie części praw w trakcie realizacji Projektu,
  - b) Osoba realizująca projekt zobowiązana jest do przekazywania dokumentów finansowych potwierdzających poniesienie wydatku do akceptacji Prorektora ds. Nauki i Współpracy z Zagranicą po uzyskaniu akceptacji wydatku przez Opiekuna naukowego,
  - c) Osoba realizująca projekt zobowiązana jest niezwłocznie poinformować Prorektora ds. Nauki i Współpracy z Zagranicą o wszelkich zagrożeniach oraz nieprawidłowościach w realizacji Projektu,
  - d) Osoba realizująca projekt zobowiązana jest do sporządzenia sprawozdania merytorycznego i finansowanego z projektu, według wzoru stanowiącego Załącznik nr 2 do Wytycznych,
  - e) Osoba realizująca projekt zobowiązana jest do prawidłowego przechowywania dokumentów projektowych,
  - f) Osoba realizująca projekt zobowiązuje się ponadto do
    - przestrzegania/poszanowania praw własności intelektualnej AWF,
    - dbania o dobre imię AWF,
    - przestrzegania zasad bezpieczeństwa i higieny pracy obowiązujących w AWF.
2. AWF zobowiązuje się do poszanowania autonomii badawczej Osoby realizującej projekt, zgodnie z zatwierdzonym Projektem i zapewnienia odpowiednich warunków do prowadzenia prac badawczych zgodnie z zakresem opisanym we wniosku o finansowanie pojedynczego działania naukowego stanowiącym Załącznik nr 1 do niniejszej umowy.
3. Prawa i obowiązki stron wynikające z niniejszej umowy nie mogą być przenoszone na osoby trzecie bez zgody AWF.

#### § 5

##### Prawa autorskie

1. Uczelnia nabywa prawo do wszystkich powstałych w wyniku realizacji projektu wskazanego w § 1 niniejszej umowy praw autorskich i dóbr niematerialnych (z chwilą ich powstania), podlegających ustawie o Prawie autorskim i prawach pokrewnych oraz ustawie Prawo własności przemysłowej.
2. Niezależnie od postanowień ust. 1, na mocy niniejszej umowy Wykonawca przenosi nieodpłatnie na uczelnię całość autorskich praw majątkowych i praw pokrewnych do wszelkich dzieł powstałych w związku z realizacją projektu badawczego wskazanego w § 1 niniejszej umowy, łącznie z wyłącznym prawem do udzielenia zezwoleń na wykonywanie zależnego prawa autorskiego, do nieograniczonego w czasie korzystania i rozporządzania przedmiotem umowy w kraju i zagranicą.
3. Uczelnia nabywa prawo do korzystania z dzieła będącego rezultatem realizacji projektu badawczego wskazanego w § 1 niniejszej umowy na następujących polach eksploatacji wskazanych poniżej:

- a) utrwalania dzieła na wszystkich nośnikach,
  - b) trwałego lub czasowego utrwalania lub zwielokrotniania utworu w całości lub w części, jakimikolwiek środkami i w jakiejkolwiek formie, niezależnie od formatu, systemu lub standardu, w tym wprowadzanie do pamięci komputera oraz trwałe lub czasowe utrwalanie lub zwielokrotnianie takich zapisów, włączając w to sporządzanie ich kopii oraz dowolne korzystanie i rozporządzanie tymi kopiami,
  - c) nadawania za pośrednictwem sieci przewodowej i bezprzewodowej, w tym sieci Internet (Intranet) lub podobnej,
  - d) wykorzystania we wszystkich środkach masowego przekazu,
  - e) publicznego rozpowszechniania, w szczególności udostępniania w ten sposób, aby każdy mógł mieć do niego dostęp w miejscu i czasie przez siebie wybranym,
  - f) wprowadzania do obrotu i dystrybucji oraz udostępniania innym instytucjom i podmiotom trzecim w ramach potrzeb AWF,
  - g) tworzenia nowych wersji i adaptacji (tłumaczenie, przystosowanie, zmianę układu lub jakiejkolwiek inne zmiany), zezwolenie na tworzenie opracowań i przeróbek oraz
  - h) rozporządzanie i korzystanie z takich opracowań na wszystkich polach eksploatacji określonych w niniejszej umowie,
  - i) rozporządzania dziełem i jego opracowaniami oraz udostępniania ich do korzystania, w tym udzielania licencji na rzecz osób trzecich, na wszystkich wymienionych powyżej polach eksploatacji.
4. Akademia i Osoba realizująca projekt każdorazowo zobowiązują się do zawarcia pomiędzy sobą odrębnej umowy przeniesienia na Akademię praw autorskich do dzieł powstałych w związku z realizacją projektu badawczego wskazanego w § 1 niniejszej umowy.
  5. Nabyte autorskie prawa majątkowe są nieograniczone w czasie.
  6. Z chwilą przyjęcia utworu przez uczelnię, Osoba realizująca projekt przenosi na uczelnię prawo własności wszystkich egzemplarzy dzieła oraz nośnika, na którym się znajduje.

## § 6

### Promocja

1. Osoba realizująca projekt zobowiązuje się umieszczać informację o finansowaniu na wszystkich materiałach wydrukowanych na potrzeby projektu.
2. Osoba realizująca projekt winna każdorazowo wskazywać afiliację przy AWF w przypadku realizacji upowszechniania działań projektowych.

## § 7

### Skutki niewykonania umowy

1. W przypadku niewykonania umowy przez Osobę realizującą projekt lub wykonania jej niezgodnie z jej postanowieniami AWF pisemnie zawiadamia Osobę realizującą projekt o stwierdzonych niezgodnościach pocztą tradycyjną lub elektroniczną na adres mailowy w domenie AWF.
2. Jeżeli niezgodności nie zostaną usunięte bądź wyjaśnione, a skutki niezgodności usunięte w terminie 10 dni kalendarzowych od otrzymania przez Osobę realizującą projekt zawiadomienia, o którym mowa w ust. 1, Rektor może rozwiązać niniejszą umowę.

## § 8

### Ochrona danych

1. Osoba realizująca projekt wyraża zgodę na przetwarzanie i przechowywanie jego danych osobowych

- przez AWF, jak i ich wykorzystywania w celu realizacji projektu i jego rozliczenia.
2. Osoba realizująca projekt jest odpowiedzialna za realizację zadań projektowych zgodnie z zapisami ustawy o ochronie danych osobowych.

§ 9

Postanowienia końcowe

1. W sprawach nieuregulowanych w niniejszej umowie oraz regulaminie mają zastosowania przepisy Kodeksu cywilnego, ustawy o prawie autorskim i prawach pokrewnych oraz prawa własności przemysłowej.
2. Wszelkie zmiany w niniejszej umowie wymagają formy pisemnej pod rygorem nieważności.
3. Umowa została sporządzona w dwóch jednobrzmiących egzemplarzach.

**PROREKTOR**  
ds. Nauki i Współpracy z Zagranicą  
prof. dr hab. Małgorzata Słowikowska  
*[Podpis]*  
**Prorektor ds. Nauki  
i Współpracy z Zagranicą**  
(pieczęć, podpis)

**PRZEWODNICZĄCY**  
**RADY KOLEGIUM NAUKOWEGO**  
Akademii Wychowania Fizycznego we Wrocławiu  
prof. dr hab. Marek Wozniowski  
*[Podpis]*  
**Przewodniczący**  
**Kolegium Naukowego**  
(pieczęć, podpis)

*[Podpis]*  
Osoba realizująca projekt

Główny Księgowy - Kwestor  
mgr inż. Zofia Jamowska  
*[Podpis]*

**Upoważnienie Rektora Akademii Wychowania Fizycznego we Wrocławiu  
do dysponowania środkami finansowymi projektu**

**Wniosek o nadanie uprawnień użytkownikowi do dysponenta w Systemie Kontroli Finansowej**

Niniejszym upoważniam

Pana/Panią	dr Anną Książek
sprawującego funkcję	Kierownika Projektu
do dysponowania środkami finansowymi do wysokości limitu przyznanego limitu na realizację	
projektu pn.	Ocena związku pomiędzy stężeniem metabolitów witaminy D a cytokin prozapalnych u sportowców
realizowanego na podstawie umowy nr zawartej z instytucją finansującą	PN/BK/M/2022/01
ze środków	Akademii Wychowania Fizycznego we Wrocławiu
	Subwencji - w ramach konkursu na finansowanie działań naukowych i projektów badawczych

od dnia 01-07-2022 na okres realizacji projektu lub do odwołania niniejszego upoważnienia.

Jednocześnie wnioskuję o nadanie w Systemie Kontroli Finansowej wyżej wymienionemu Pracownikowi uprawnień użytkownika dla wskazanego poniżej dysponenta/dysponentów:

Nazwa dysponenta	Unikalny kod dysponenta
Ocena związku pomiędzy stężeniem metabolitów witaminy D a cytokin prozapalnych u sportowców	Z.22.01

Niniejsze upoważnienie uprawnia Panią/Pana do powierzenia obowiązków, związanych z obsługą dysponenta w Systemie Kontroli Finansowej, w szczególności do składania planów i zamówień, rozliczania zamówień, dokonywania przesunięć środków, podległemu Pani /Panu pracownikowi.

Data: 12-07-2022  
Podpis Rektora: REKTOR  
prof. dr hab. Andrzej Rokita

Data: 11.07.2022  
Kontrasygna Głównego Księgowego - Kwestora: Główny Księgowy - Kwestor  
mgr inż. Zofia Tarnowska

**Oświadczenie Pracownika**

Niniejszym przyjmuję obowiązki wynikające z niniejszego upoważnienia, w szczególności odpowiedzialność za powierzone mi środki publiczne. Zobowiązuję się do przestrzegania, podczas ich wydatkowania, obowiązujących przepisów prawa, w szczególności przepisów ustawy o finansach publicznych, ustawy o odpowiedzialności za naruszenie dyscypliny finansów publicznych, ustawy Prawo zamówień publicznych, Kodeksu pracy oraz ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym, postanowień umowy o finansowanie projektu, a także zasad gospodarki finansowej i regulacji wewnętrznych obowiązujących w Akademii Wychowania Fizycznego we Wrocławiu, które nakładają obowiązek wydatkowania środków publicznych zgodnie z zasadą gospodarności, tj. w sposób celowy i oszczędny, prowadzący jednocześnie do uzyskiwania najlepszych efektów.

Równocześnie zobowiązuję się do uzyskania zgód i kontrasygnat osób uprawnionych, na wszelkich dyspozycjach środkami finansowymi w ramach przyznanych mi środków finansowych.

Data: 5.09.2022

Podpis Pracownika: Anna Książek

Wypełnia pracownik działu Księgowości

**Numer w rejestrze Upoważnień do dysponowania środkami B/1/2022**

Data przyjęcia Upoważnienia

Podpis pracownika działu Księgowości



PODPIS ZAUFANY

ANNA  
KSIĄŻEK

14.12.2023 18:35:07 [GMT+1]

Dokument podpisany elektronicznie  
podpisem zaufanym



**Upoważnienie Rektora Akademii Wychowania Fizycznego we Wrocławiu  
do dysponowania środkami finansowymi projektu**

**Wniosek o nadanie uprawnień użytkownikowi do dysponenta w Systemie Kontroli Finansowej**

Niniejszym upoważniam

Pana/Panią

**dr inż. Annę Książek**

sprawującego funkcję

**Kierownika Projektu**

do dysponowania środkami finansowymi do wysokości limitu przyznanego limitu na realizację

projektu pn.

**Metabolity witaminy D a zdolności wysiłkowe u sportowców**

realizowanego na

**PN/BK/M/2022/03**

podstawie umowy nr

zawartej z instytucją

finansującą

**Akademią Wychowania Fizycznego we Wrocławiu**

ze środków

**Subwencji - w ramach konkursu na finansowanie działań naukowych i projektów badawczych**

od dnia 01-07-2022 na okres realizacji projektu lub do odwołania niniejszego upoważnienia.

Jednocześnie wnioskuję o nadanie w Systemie Kontroli Finansowej wyżej wymienionemu Pracownikowi uprawnień użytkownika dla wskazanego poniżej dysponenta/dysponentów:

**Nazwa dysponenta**

**Unikalny kod dysponenta**

Metabolity witaminy D a zdolności wysiłkowe u sportowców

Z.22.06

Niniejsze upoważnienie uprawnia Panią/Pana do powierzenia obowiązków, związanych z obsługą dysponenta w Systemie Kontroli Finansowej, w szczególności do składania planów i zamówień, rozliczania zamówień, dokonywania przesunięć środków, podległemu Pani /Panu pracownikowi.

Data

12.07.2022

Data

11.07.2022

Podpis Rektora

**REKTOR**  
*prof. dr hab. Andrzej Rokita*

Kontrasygnata Głównego  
Księgowego - Kwestora

*Główny Księgowy - Kwestor*  
*mgr inż. Zofia Tarnowska*

**Oświadczenie Pracownika**

Niniejszym przyjmuję obowiązki wynikające z niniejszego upoważnienia, w szczególności odpowiedzialność za powierzone mi środki publiczne. Zobowiązuję się do przestrzegania, podczas ich wydatkowania, obowiązujących przepisów prawa, w szczególności przepisów ustawy o finansach publicznych, ustawy o odpowiedzialności za naruszenie dyscypliny finansów publicznych, ustawy Prawo zamówień publicznych, Kodeksu pracy oraz ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym, postanowień umowy o finansowanie projektu, a także zasad gospodarki finansowej i regulacji wewnętrznych obowiązujących w Akademii Wychowania Fizycznego we Wrocławiu, które nakładają obowiązek wydatkowania środków publicznych zgodnie z zasadą gospodarności, tj. w sposób celowy i oszczędny, prowadzący jednocześnie do uzyskiwania najlepszych efektów.

Równocześnie zobowiązuję się do uzyskania zgód i kontrasygnat osób uprawnionych, na wszelkich dyspozycjach środkami finansowymi w ramach przyznanych mi środków finansowych.

Data

5.08.2022

Podpis Pracownika

*Anna Książek*

Wypełnia pracownik działu Księgowości

**Numer w rejestrze Upoważnień do dysponowania środkami B/6/2022**

Data przyjęcia  
Upoważnienia

Podpis pracownika działu  
Księgowości



PODPIS ZAUFANY

ANNA  
KSIĄŻEK

14.12.2023 18:37:16 [GMT+1]

Dokument podpisany elektronicznie  
podpisem zaufanym



**Upoważnienie Rektora Akademii Wychowania Fizycznego we Wrocławiu  
do dysponowania środkami finansowymi projektu**

**Wniosek o nadanie uprawnień użytkownikowi do dysponenta w Systemie Kontroli Finansowej**

Niniejszym upoważniam

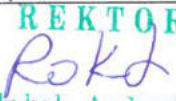
Pana/Panią	dr Anny Książek
sprawującego funkcję	Kierownika projektu
do dysponowania środkami finansowymi do wysokości limitu przyznanego limitu na realizację projektu pn.	Stężenie metabolitów tryptofanu jako markery przemęczenia i przetrenowania u profesjonalnych sportowców
realizowanego na podstawie umowy nr zawartej z instytucją finansującą	2023/07/X/NZ4/00199
ze środków	Narodowe Centrum Nauki (NCN)
	w ramach konkursu MINIATURA 7


od dnia 12-09-2023 na okres realizacji projektu lub do odwołania niniejszego upoważnienia.

Jednocześnie wnioskuję o nadanie w Systemie Kontroli Finansowej wyżej wymienionemu Pracownikowi uprawnień użytkownika dla wskazanego poniżej dysponenta/dysponentów:

Nazwa dysponenta	Unikalny kod dysponenta
G.KA0199 - A. Książek - Stężenie metabolitów tryptofanu jako markery przemęczenia i przetrenowania u profesjonalnych sportowców	G.KA0199

Niniejsze upoważnienie uprawnia Panią/Pana do powierzenia obowiązków, związanych z obsługą dysponenta w Systemie Kontroli Finansowej, w szczególności do składania planów i zamówień, rozliczania zamówień, dokonywania przesunięć środków, podległemu Pani /Panu pracownikowi.

Data: 13.09.2023  
Podpis Rektora:   
prof. dr hab. Andrzej Rokita

Data: 13.09.2023  
Kontrasygnata Głównego Księgowego - Kwestora:   
mgr M. Kowalska

**Oświadczenie Pracownika**

Niniejszym przyjmuję obowiązki wynikające z niniejszego upoważnienia, w szczególności odpowiedzialność za powierzone mi środki publiczne. Zobowiązuję się do przestrzegania, podczas ich wydatkowania, obowiązujących przepisów prawa, w szczególności przepisów ustawy o finansach publicznych, ustawy o odpowiedzialności za naruszenie dyscypliny finansów publicznych, ustawy Prawo zamówień publicznych, Kodeksu pracy oraz ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym, postanowień umowy o finansowanie projektu, a także zasad gospodarki finansowej i regulacji wewnętrznych obowiązujących w Akademii Wychowania Fizycznego we Wrocławiu, które nakładają obowiązek wydatkowania środków publicznych zgodnie z zasadą gospodarności, tj. w sposób celowy i oszczędny, prowadzący jednocześnie do uzyskiwania najlepszych efektów.

Równocześnie zobowiązuję się do uzyskania zgód i kontrasygnat osób uprawnionych, na wszelkich dyspozycjach środkami finansowymi w ramach przyznaných mi środków finansowych.

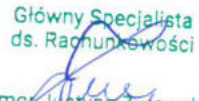
Data: 26.09.2023

Podpis Pracownika: 


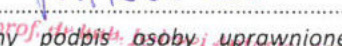
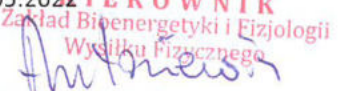

Wypełnia pracownik działu Księgowości

**Numer w rejestrze Upoważnień do dysponowania środkami B/8/2023**

Data przyjęcia Upoważnienia: 26-09-2023

Podpis pracownika działu Księgowości:   
mgr Justyna Żurawek

**POTWIERDZENIE ODBYCIA STAŻU**  
(wypełnia instytucja przyjmująca po zakończeniu stażu)

Potwierdzenie odbycia stażu	Certificate of Internship
Zaświadcza się, że:	This is to certify that:
Pani	Ms/Mr:
<b>Anna Książek</b> (imię i nazwisko)	<b>Anna Książek</b> (full name)
zatrudniony w:	employed at:
Akademii Wychowania Fizycznego we Wrocławiu, odbyła staż naukowy w:	University School of Physical Education in Wrocław, Poland, completed a research internship with:
<b>Gdański Uniwersytet Medyczny</b> ul. M. Skłodowskiej-Curie 3a, 80-210 Gdańsk (nazwa instytucji przyjmującej)	<b>Medical University Of Gdańsk</b> M. Skłodowskiej-Curie 3a street, 80-210 Gdańsk, POLAND (name of hosting institution)
<b>Wydział Nauk o Zdrowiu z Instytutem Medycyny Morskiej i Tropikalnej</b> <b>Zakład Bioenergetyki i Fizjologii Wysiłku Fizycznego</b> (nazwa przyjmującej jednostki organizacyjnej)	<b>Faculty of Health Sciences with the Institute of Maritime and Tropical Medicine</b> <b>Division of Bioenergetics and Physiology of Exercise</b> (name of hosting organizational unit)
w celu realizacji (zaznacz właściwe „x”):	and in the scope of the internship (tick appropriate):
<input checked="" type="checkbox"/> badań naukowych	<input checked="" type="checkbox"/> conducted research
<input type="checkbox"/> zajęć dydaktycznych	<input type="checkbox"/> performed didactic tasks
<input type="checkbox"/> badań naukowych i prowadzenia zajęć	<input type="checkbox"/> conducted research and didactic tasks
<input type="checkbox"/> innych zadań (jakich): .....	<input type="checkbox"/> performed other tasks (please, specify): .....
w okresie od dnia: <b>23.05.2022</b>	in the period from: <b>23.05.2022</b>
do dnia: <b>5.06.2022</b>	to: <b>5.06.2022</b>
Podpisano przez:	Signed by:
<b>Kierownik Zakładu Bioenergetyki i Fizjologii Wysiłku Fizycznego</b> <b>prof. dr hab. med. Jędrzej Antosiewicz</b> (tytuł, imię i nazwisko)	<b>Head of Faculty of Health Sciences with the Institute of Maritime and Tropical Medicine</b> <b>prof. dr hab. med. Jędrzej Antosiewicz</b> (title and full name)
Dnia: 3.05.2022	Date: 3.05.2022
 	 
(czytelny podpis osoby uprawnionej w instytucji lub jednostce organizacyjnej przyjmującej)	(legible signature of an entitled representative of the host institution or unit)
<b>GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY</b> Wydział Nauk o Zdrowiu Zakład Bioenergetyki i Fizjologii Wysiłku Fizycznego 80-211 Gdańsk, ul. Dębinki 1 tel. 058 349 14 50, fax 058 349 14 56	<b>GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY</b> Wydział Nauk o Zdrowiu Zakład Bioenergetyki i Fizjologii Wysiłku Fizycznego 80-211 Gdańsk, ul. Dębinki 1 tel. 058 349 14 50, fax 058 349 14 56
(pieczęć instytucji przyjmującej)	(stamp of the host institution)



PODPIS ZAUFANY

ANNA  
KSIĄŻEK  
14.12.2023 18:42:16 [GMT+1]  
Dokument podpisany elektronicznie  
podpisem zaufanym



## RESEARCH INTERNSHIP CONFIRMATION

Internship participant: Anna Książek, PhD

Name of organization: Department of Biological and Medical Basis of Sport,  
University School of Physical Education, Wrocław, Poland

Address: I.J. Paderewskiego 35 avenue Wrocław 51-612, Poland

**I would like to confirm that Dr. Anna Książek completed a research internship as indicated below:**

Name of organization: IRCCS Istituto Ortopedico Galeazzi, Milan, Italy

Name of supervisor: Prof. Giovanni Lombardi, PhD

Address: Via Riccardo Galeazzi, 4 - 20161, Milan, Italy

Phone: +39 02 6621 4068/4754/4759; e-mail: [giovanni.lombardi@grupposandonato.it](mailto:giovanni.lombardi@grupposandonato.it)

Internship began: 08/31/2021

Internship ended: 09/14/2021

**The research internship included following tasks:**

- Laboratory activities,
- Activities related with scientific project entitled 'Free, total vitamin D and athletic performance in athletes.'

Sincerely,

Giovanni Lombardi

Head of the Laboratory of Experimental Biochemistry and Molecular Biology

IRCCS Istituto Ortopedico Galeazzi

Milano, Italia

Associate Professor

Department of Athletics, Strength and Conditioning

Poznań University of Physical Education

Poznań, Poland



PODPIS ZAUFANY

ANNA  
KSIĄŻEK

14.12.2023 18:44:31 [GMT+1]

Dokument podpisany elektronicznie  
podpisem zaufanym



# POTWIERDZENIE ODBYCIA STAŻU

Potwierdzenie odbycia stażu	Certificate of Internship								
<p>Zaświadcza się, że: Pani: Dr inż. Anna Książek</p> <p>zatrudniony w: Akademii Wychowania Fizycznego im. Polskich Olimpijczyków we Wrocławiu, odbyła staż naukowy w: Laboratorium Biochemii Eksperymentalnej i Biologii Molekularnej IRCCS Ospedale Galeazzi – Sant’Ambrogio, Mediolan (Włochy)</p> <p>w celu realizacji (zaznacz właściwe „x”):</p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 5%; text-align: center; border: 1px solid black;"><input checked="" type="checkbox"/></td> <td style="border: 1px solid black;">badań naukowych w ramach realizacji projektu pt. „Batokine influenzate dall’attività fisica: analisi dei loro effetti sul cross-talk muscolo, osso e tessuto adiposo” zarejestrowanego pod numerem L4170</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; border: 1px solid black;"><input checked="" type="checkbox"/></td> <td style="border: 1px solid black;">innych zadań: wymiana doświadczeń i opracowanie koncepcji wspólnego projektu badawczego</td> </tr> </table> <p>w okresie od dnia: 29.05.2023 do dnia: 9.06.2023</p> <p>Podpisano przez: Prof. Giovanni Lombardi, PhD, EuSpLM</p> <p>Dnia: <u>9.06.2023</u> (dd.mm.rrrr)</p> <p style="text-align: center;">I.R.C.C.S. Ospedale Galeazzi - Sant’Ambrogio - 030941 Direzione Scientifica</p> <p style="text-align: center;">..... (czytelny podpis osoby uprawnionej w instytucji lub jednostce organizacyjnej przyjmującej)</p> <p style="text-align: center;">(pieczęć instytucji przyjmującej)</p>	<input checked="" type="checkbox"/>	badań naukowych w ramach realizacji projektu pt. „Batokine influenzate dall’attività fisica: analisi dei loro effetti sul cross-talk muscolo, osso e tessuto adiposo” zarejestrowanego pod numerem L4170	<input checked="" type="checkbox"/>	innych zadań: wymiana doświadczeń i opracowanie koncepcji wspólnego projektu badawczego	<p>This is to certify that: Ms: Anna Książek, PhD, Eng.</p> <p>employed at: Wroclaw University of Health and Sport Sciences, Poland, completed a research internship with:</p> <p>Laboratory of Experimental Biochemistry &amp; Molecular Biology IRCCS Ospedale Galeazzi – Sant’Ambrogio, Milan (Italy)</p> <p>and in the scope of the internship:</p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 5%; text-align: center; border: 1px solid black;"><input checked="" type="checkbox"/></td> <td style="border: 1px solid black;">conducted research as part of the implementation of the project entitled ‘Batokines influenced by physical activity: analysis of their effects on muscle bone and adipose tissue cross-talk’ registered under number L4170</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; border: 1px solid black;"><input checked="" type="checkbox"/></td> <td style="border: 1px solid black;">performed other tasks: exchange of knowledge and experience, and preparation of the conceptualization of the common project</td> </tr> </table> <p>in the period from 29<sup>th</sup> May 2023 to 9<sup>th</sup> June 2023</p> <p>Signed by: Prof. Giovanni Lombardi, PhD, EuSpLM</p> <p>Date: <u>9.06.2023</u> (dd.mm.yyyy)</p> <p style="text-align: center;">I.R.C.C.S. Ospedale Galeazzi - Sant’Ambrogio - 030941 Direzione Scientifica</p> <p style="text-align: center;">..... (legible signature of an entitled representative of the host institution or unit)</p> <p style="text-align: center;">(stamp of the host institution)</p>	<input checked="" type="checkbox"/>	conducted research as part of the implementation of the project entitled ‘Batokines influenced by physical activity: analysis of their effects on muscle bone and adipose tissue cross-talk’ registered under number L4170	<input checked="" type="checkbox"/>	performed other tasks: exchange of knowledge and experience, and preparation of the conceptualization of the common project
<input checked="" type="checkbox"/>	badań naukowych w ramach realizacji projektu pt. „Batokine influenzate dall’attività fisica: analisi dei loro effetti sul cross-talk muscolo, osso e tessuto adiposo” zarejestrowanego pod numerem L4170								
<input checked="" type="checkbox"/>	innych zadań: wymiana doświadczeń i opracowanie koncepcji wspólnego projektu badawczego								
<input checked="" type="checkbox"/>	conducted research as part of the implementation of the project entitled ‘Batokines influenced by physical activity: analysis of their effects on muscle bone and adipose tissue cross-talk’ registered under number L4170								
<input checked="" type="checkbox"/>	performed other tasks: exchange of knowledge and experience, and preparation of the conceptualization of the common project								



**PODPIS ZAUFANY**

**ANNA  
KSIAZEK**  
14.12.2023 18:46:50 [GMT+1]  
Dokument podpisany elektronicznie  
podpisem zaufanym