



Akademia Wychowania Fizycznego
im. Eugeniusza Piaseckiego w Poznaniu

mgr Natalia Głowska

**Efekt podaży różnych dawek kofeiny na zdolności wysiłkowe
oraz stężenie kofeiny i paraksantyny we krwi i ślinie
u osób trenujących CrossFit**

Rozprawa doktorska

Promotor:
prof. AWF dr hab. inż. Krzysztof Durkalec-Michalski

Poznań 2025

*Nigdy nie rezygnuj ze swojego marzenia tylko dlatego,
że osiągnięcie go wymaga czasu.
Czas i tak upłynie.*
Earl Nightingale

SPIS TREŚCI

DANE O KANDYDATCE	5
WYKAZ SKRÓTÓW	6
STRESZCZENIE	8
ABSTRACT	10
1. WSTĘP	12
2. CELE I HIPOTEZY	16
3. CYKL PUBLIKACJI	18
4. MATERIAŁ I METODY	19
4.1. Schemat badań (publikacje 1 i 2)	19
4.2. Grupa badana (publikacje 1 i 2)	19
4.3. Protokół suplementacyjny (publikacje 1 i 2)	21
4.4. Pomiar wskaźników antropometrycznych i składu ciała (publikacje 1 i 2)	21
4.5. Ocena sposobu żywienia (publikacje 1 i 2)	22
4.6. Ocena specyficznych zdolności wysiłkowych za pomocą testu <i>Fight Gone Bad</i> wraz z monitoringiem częstości skurczów serca i oceną subiektywnego odczucia zmęczenia (publikacja 1)	22
4.7. Pomiar czasu reakcji (publikacja 1)	23
4.8. Pomiar stabilności posturalnej (publikacja 1)	24
4.9. Pobór i analiza materiału biologicznego (publikacje 1 i 2)	24
4.9.1. Analiza stężenia mleczanu i pirogronianu (publikacja 2)	25
4.9.2. Analiza stężenia kofeiny i paraksantyny (publikacja 2)	25
4.9.3. Analiza aktywności enzymu CYP1A2 (publikacja 2)	25
4.9.4. Analiza polimorfizmów pojedynczych nukleotydów CYP1A2 i ADORA2A (publikacje 1 i 2)	26
4.10. Analiza statystyczna (publikacje 1 i 2)	26
5. WYNIKI	28
5.1. Specyficzne dla CrossFit/HIFT zdolności wysiłkowe oceniane w teście <i>Fight Gone Bad</i> wraz z monitoringiem częstości skurczów serca i oceną subiektywnego odczucia zmęczenia (publikacja 1)	28
5.2. Czas reakcji i stabilność posturalna (publikacja 1)	28
5.3. Korelacje pomiędzy wynikami testu <i>Fight Gone Bad</i> , częstością skurczów serca, subiektywnym odczuciem zmęczenia, czasem reakcji i stabilnością posturalną (publikacja 1)	29
5.4. Stężenie mleczanu i pirogronianu (publikacja 1)	29
5.5. Stężenie kofeiny i paraksantyny (publikacja 2).....	29
5.5.1. Analiza regresji wielomianowej (szacowanie stężenia kofeiny i paraksantyny w ślinie na podstawie stężenia w surowicy oraz odwrotnie)....	29
5.5.2. Zmiany stężenia kofeiny i paraksantyny w surowicy krwi i ślinie.....	30

5.6. Aktywność enzymu CYP1A2 (publikacja 2)	31
5.7. Polimorfizmy pojedynczych nukleotydów <i>CYP1A2</i> i <i>ADORA2A</i> (publikacje 1 i 2)	31
6. DYSKUSJA	32
6.1. Ograniczenia projektu	43
6.2. Mocne strony projektu	44
7. WNIOSKI	46
8. PIŚMIENNICTWO	47
PODZIĘKOWANIA	56
PRZEBIEG PRACY NAUKOWO-ZAWODOWEJ – INFORMACJE DODATKOWE	57
ZAŁĄCZNIK 1. OŚWIADCZENIA	62
ZAŁĄCZNIK 2. PUBLIKACJE	75

DANE O KANDYDATCE

Data uzyskania tytułu magistra: 3.07.2015 r.

Nazwa jednostki organizacyjnej, w której nadany został tytuł: Wydział Nauk o Zdrowiu Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

Kandydatka nie ubiegała się wcześniej o nadanie stopnia doktora.

Aktualne miejsce pracy: Zakład Dietetyki Sportowej, Akademia Wychowania Fizycznego im. Eugeniusza Piaseckiego w Poznaniu.

Zajmowane stanowisko: od 1.10.2022 r. asystent badawczo-dydaktyczny.

WYKAZ SKRÓTÓW

ADORA2A – gen receptora adenozyiny A2A

Area95 – obszar obejmujący 95% ścieżki przemieszczeń środka siły nacisku stóp

BASE (ang. *baseline*) – pomiar bez interwencji związanej z podażą kofeiny lub placebo

BM (ang. *body mass*) – masa ciała

CAF (ang. *caffeine*) – kofeina

COP – środek siły nacisku stóp

C_t – stężenie w pojedynczym punkcie czasowym

CYP1A2 – gen kodujący enzym cytochrom P450 1A2

CYP1A2 – jeden z enzymów z grupy cytochromu P450, odgrywający kluczową rolę w metabolizmie kofeiny

D – czynnik wewnątrzgrupowy dawki

ES (ang. *effect size*) – wielkość efektu

FGB (ang. *Fight Gone Bad*) – test specyficznych zdolności wysiłkowych w CrossFit/HIFT

FGB_{Total} – wynik testu FGB obejmujący całkowitą liczbę powtórzeń podczas wszystkich trzech rund testu

GLM (ang. *general linear model*) – ogólny model liniowy

HIFT (ang. *high-intensity functional training*) – trening funkcjonalny o wysokiej intensywności

HIGH – dawka kofeiny wynosząca 9 mg_{CAF}/kg_{BM}

HR (ang. *heart rate*) – częstość skurczów serca

HR_{max} (ang. *maximum heart rate*) – maksymalna częstość skurczów serca

HR_{mean} (ang. *mean heart rate*) – średnia częstość skurczów serca

La – mleczan

LOW – dawka kofeiny wynosząca 3 mg_{CAF}/kg_{BM}

MEDIUM – dawka kofeiny wynosząca 6 mg_{CAF}/kg_{BM}

M_{Time} (ang. *motor time*) – czas motoryczny

Pa – pirogronian

PLA (ang. *placebo*) – placebo

PRX (ang. *paraxanthine*) – paraksantyna

PRX/CAF RATIO (ang. *paraxanthine to caffeine ratio*) – stosunek paraksantyny do kofeiny

P_{Stab} (ang. *postural stability*) – stabilność posturalna

R₁₋₃ – kolejne rundy w teście FGB

RPE (ang. *rating of perceived exertion*) – subiektywne odczucie zmęczenia

R_{Time} (ang. *reaction time*) – czas reakcji

SNP (ang. *single nucleotide polymorphism*) – polimorfizm pojedynczego nukleotydu

T₀₋₄ – kolejność wizyt badawczych

TP – czynnik wewnątrzgrupowy punktu czasowego

V_{COP} – prędkość przemieszczania się środka siły nacisku stóp

STRESZCZENIE

Wstęp. Suplementacja kofeiną (CAF) poprawia wydolność fizyczną i predyspozycje motoryczne w szerokim zakresie zadań wysiłkowych. Niemniej zależny od dawki wpływ CAF na specyficzne zdolności wysiłkowe oraz funkcje poznawcze w CrossFit/HIFT (trening funkcjonalny o wysokiej intensywności), jak również metabolizm CAF nie zostały jednoznacznie wyjaśnione. Celem niniejszej pracy była ocena wpływu suplementacji trzech różnych dawek CAF (3, 6 i 9 mg_{CAF}/kg_{BM}) na zdolności wysiłkowe, częstość skurczów serca (HR), subiektywne odczucie zmęczenia (RPE), czas reakcji (R_{Time}), stabilność posturalną (P_{Stab}), stężenie mleczanu (*La*) i pirogronianu (*Pa*) we krwi oraz zmiany stężenia CAF, paraksantyny (PRX) i PRX/CAF RATIO w surowicy krwi i ślinie w czterech różnych punktach czasowych.

Metody. W randomizowanych, podwójnie zaślepionych, kontrolowanych placebo (PLA) badaniach z zastosowaniem układu krzyżowego poddano ocenie wpływ suplementacji CAF zażywanej przed wysiłkiem u 26 osób trenujących CrossFit/HIFT (16 mężczyzn, 10 kobiet; wiek: 35,4 ± 6,5 roku; masa ciała: 77,4 ± 16,6 kg; wysokość ciała: 175 ± 9 cm). Protokół badań obejmował pięć oddzielnych wizyt badawczych. Głównym zadaniem badanych było wykonanie testu wysiłkowego *Fight Gone Bad* (FGB), celem oceny specyficznych zdolności wysiłkowych. W trakcie wysiłku monitorowano HR za pomocą systemu telemetrycznego. Po wysiłku uczestnicy dokonali oceny RPE (skala Borga), natomiast zarówno przed wysiłkiem, jak i po nim oceniano wskaźniki R_{Time} (Wiedeński System Testów) i P_{Stab} (platforma posturograficzna). Ponadto w czterech punktach czasowych (0', 30', 60', 90') wykonano analizy biochemiczne stężenia *La* i *Pa* w surowicy krwi (metoda fluorometryczna), stężenia CAF i PRX (wysokosprawna chromatografia cieczowa). Oceniono także PRX/CAF RATIO w surowicy krwi i ślinie, jak również aktywność enzymu CYP1A2 (skorygowany o czas współczynnik PRX/CAF RATIO w ślinie). W analizach uwzględniono również polimorfizm pojedynczego nukleotydu *CYP1A2* (rs762551) i *ADORA2A* (rs5751876) (reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym). Analizy statystyczne przeprowadzono głównie z zastosowaniem ogólnego modelu liniowego, w tym testów wariancji oraz analizy *post hoc*. Dodatkowo, za pomocą analizy regresji wielomianowej, oceniono stopień szacowania zmiennej stężenia CAF i PRX w surowicy krwi na podstawie zmiennej stężenia CAF i PRX w ślinie (oraz odwrotnie). W celu oceny korelacji w zależności od rozkładu zmiennych zastosowano test korelacji Pearsona lub test rho Spearmana. Za statystycznie istotny wynik przyjęto wartość $p < 0,05$.

Wyniki. *Publikacja 1.* Suplementacja 6 mg_{CAF}/kg_{BM} wywołała zauważalną u badanych poprawę wyniku w teście wysiłkowym FGB (FGB_{Total}), R_{Time} oraz przedwysiłkowym czasie motorycznym. Niemniej jednak nie zaobserwowano istotnych różnic między odmiennymi dawkami CAF a PLA w zakresie wyników FGB_{Total}, HR_{max}, HR_{mean}, RPE, zmiennych R_{Time} przed/po FGB ani P_{Stab} czy stężenia *Pa*. Stężenie *La* było jednakże wyższe przed i po wysiłku po zastosowaniu każdej z dawek CAF w porównaniu z PLA. Nie stwierdzono natomiast wpływu genotypów *CYP1A2* ani *ADORA2A* na specyficzne zdolności wysiłkowe badanych. *Publikacja 2.* Pomimo istotnych różnic w stężeniach CAF i PRX pomiędzy surowicą a śliną nie stwierdzono różnicy w PRX/CAF RATIO. Uwagę zwraca jednak ujawniony efekt

interakcji dawki i punktów czasowych dla stężenia PRX. Główne efekty dawki zaobserwowano dla CAF oraz PRX/CAF RATIO. Główny efekt punktów czasowych zarejestrowano jedynie dla CAF analizowanej w surowicy krwi.

Wnioski. *Publikacja 1.* Zależny od dawki efekt suplementacji CAF wydaje się ograniczać do zmian uznawanych z punktu widzenia praktyki sportowej za znaczące, ale bez statystycznej istotności różnic, w zakresie specyficznych dla CrossFit/HIFT zdolności wysiłkowych, R_{Time} , P_{Stab} , RPE oraz HR. Jednakże w kontekście praktycznego wpływu CAF na wyniki uzyskiwane w CrossFit/HIFT dawka $6 \text{ mg}_{CAF}/\text{kg}_{BM}$ może być uznana za najbardziej racjonalną strategię suplementacyjną. *Publikacja 2.* Potwierdzono zależny od dawki i czasu efekt suplementacji CAF na stężenie CAF i PRX w surowicy krwi i ślinie sportowców, choć dawka CAF nie miała jednak wpływu na aktywność enzymu CYP1A2. Nie wykazano także interakcji CYP1A2 z indukowalnością tego enzymu. Ostatecznie, korelacja CAF/PRX wskazuje na możliwość zamiennego stosowania analiz krwi i/lub śliny w badaniach wysiłkowych.

ABSTRACT

Introduction. Caffeine (CAF) supplementation improves physical performance and motor predispositions across a wide range of exercise tasks. However, the dose-dependent effect of CAF on specific exercise performance, cognitive functions in CrossFit/HIFT (high-intensity functional training), and CAF metabolism, remain inconclusive. The aim of this study was to assess the effects of three different doses of CAF supplementation (3, 6, and 9 mg_{CAF}/kg_{BM}) on exercise performance, heart rate (HR), rating of perceived exertion (RPE), reaction time (R_{Time}), postural stability (P_{Stab}), lactate (La) and pyruvate (Pa) concentrations in blood, as well as changes in CAF, paraxanthine (PRX) concentrations and the PRX/CAF RATIO in blood serum and saliva at four different time points.

Methods. In a randomized, double-blind, placebo (PLA)-controlled crossover study, the effect of supplementation of CAF administered prior to exercise was assessed in 26 CrossFit/HIFT – trained participants (16 males, 10 females; age: 35.4 ± 6.5 years; body mass: 77.4 ± 16.6 kg; height: 175 ± 9 cm). The study protocol consisted of five separate study visits. Participants performed the Fight Gone Bad (FGB) exercise test to assess specific physical abilities. During exercise, HR was monitored via a telemetry system. Post-exercise, participants rated RPE using the Borg scale, while both pre- and post-exercise, R_{Time} (Vienna Test System) and P_{Stab} (posturographic platform) were assessed. Furthermore, biochemical analyses of La and Pa concentrations in blood serum (fluorometric method), CAF and PRX concentrations (high-performance liquid chromatography), the PRX/CAF RATIO in blood serum and saliva, as well as the CYP1A2 enzyme activity (corrected for time with the PRX/CAF RATIO in saliva) were performed at four time points (0', 30', 60', 90'). The analyses also considered the single nucleotide polymorphisms of CYP1A2 (rs762551) and ADORA2A (rs5751876) (real-time polymerase chain reaction). Statistical analyses were mainly conducted using a general linear model, including variance tests and *post hoc* analysis. Additionally, polynomial regression analysis was used to assess the degree of explanation of the CAF and PRX concentrations in blood based on the CAF and PRX concentrations in saliva (and vice versa). To assess correlations between variables, Pearson's correlation test or Spearman's rho test was applied, depending on the distribution of the variables. A p-value < 0.05 was considered statistically significant.

Results. *Publication 1.* Supplementation of 6 mg_{CAF}/kg_{BM} induced noticeable improvements in FGB test score (FGB_{Total}), R_{Time} , and pre-exercise motor time. However, no significant differences were observed between different CAF doses and PLA regarding FGB_{Total} results, HR_{max} , HR_{mean} , RPE, pre/post-exercise R_{Time} , P_{Stab} , or Pa concentrations. La concentrations, however, were higher both pre- and post-exercise following all CAF doses compared to PLA. No effects of CYP1A2 or ADORA2A genotypes on specific physical abilities were found. *Publication 2.* Despite significant differences in CAF and PRX concentrations between serum and saliva, no differences were observed in the PRX/CAF RATIO. Noteworthy was the dose-by-time interaction effect on PRX concentrations. Main dose effects were observed for CAF concentrations and the PRX/CAF RATIO, while a main time effect was noted only for serum CAF concentrations.

Conclusions. *Publication 1.* The dose-dependent effects of CAF supplementation appear to be limited to changes considered significant from a sports practice perspective, without statistically significant differences, in CrossFit/HIFT-specific physical abilities, R_{Time} , P_{Stab} , RPE, and HR. However, in the context of practical applications, a $6 \text{ mg}_{\text{CAF}}/\text{kg}_{\text{BM}}$ can be considered the most rational supplementation strategy for improving CrossFit/HIFT performance outcomes. *Publication 2.* A dose- and time-dependent effect of CAF supplementation on CAF and PRX concentrations in blood serum and saliva was confirmed, although CAF dose did not influence CYP1A2 enzyme activity. Moreover, no interaction between *CYP1A2* genotypes and enzyme inducibility was observed. Finally, the CAF/PRX correlation suggests that blood and/or saliva analyses may be interchangeably used in exercise-related studies.

1. WSTĘP

Kofeina (CAF) jest naturalnym stymulantem, który od dawna cieszy się popularnością jako środek poprawiający zdolności wysiłkowe i wydolność fizyczną u osób aktywnych fizycznie (Grgic i in. 2020; Guest i in. 2021). Przeprowadzony niedawno parasolowy przegląd systematyczny, obejmujący 21 metaanaliz dotyczących suplementacji CAF i wydolności fizycznej (Grgic i in. 2020), potwierdza jej pozytywny wpływ na siłę, wytrzymałość mięśni, moc anaerobową oraz wydolność tlenową. Standardowo w badaniach stosuje się dawki 3–6 mg_{CAF}/kg_{BM}, podawane na 30–60 minut przed wysiłkiem. Przyjmuje się jednak, że optymalne dawkowanie pozostaje nadal nieustalone, bowiem efekt stosowanych dawek może różnić się w zależności od specyfiki wysiłku fizycznego, codziennego spożycia CAF, doświadczenia treningowego, płci lub osobniczych możliwości metabolizowania CAF (Grgic i in. 2020; Guest i in. 2021; Saunders i in. 2023). Głównym postulowanym mechanizmem działania CAF jest wiązanie z receptorami adenozynowymi w centralnym układzie nerwowym. Jej wpływ może się także łączyć z innymi mechanizmami, zwłaszcza zwiększeniem dostępności jonów Ca²⁺ w miofibrach lub optymalizacją metabolizmu wysiłkowego i dostępnością substratów energetycznych (Guest i in. 2021; Saunders i in. 2023).

CAF jest szybko wchłaniana w przewodzie pokarmowym, a niemal 99% dawki trafia do krwiobiegu w ciągu 45 minut od spożycia. Proces ten przebiega w podobny sposób niezależnie od płci, wieku, czynników genetycznych czy ekspozycji na nikotynę, alkohol lub leki (Nehlig 2018). Czas wchłaniania zależy jednak od formy podaży – CAF zażywana w postaci kapsułek jest wchłaniana znacznie szybciej niż napoje (np. cola) lub czekolada, odpowiednio w ciągu 30 minut i 1,5–2 godzin. Maksymalne stężenie CAF jest niższe o około 25% po spożyciu napojów w porównaniu z ~2,05 µg/mL po zażyciu formy kapsułkowej (Nehlig 2018). Mimo że CAF jest wchłaniana głównie przez przewód pokarmowy (80% w jelicie cienkim i 20% w żołądku) (Nehlig 2018; Reddy i in. 2024), ostatnio wysunięto także hipotezę, że wchłanianie CAF może odbywać się również przez błonę śluzową jamy ustnej i tą drogą wpływać na poprawę wydolności fizycznej. Mimo że ilość CAF wchłanianej przez błonę śluzową jamy ustnej nie jest jasna, wykazano, że podawanie jej w formie alternatywnej, np. gumy do żucia, może przyspieszać jej absorpcję dzięki wchłanianiu przez silnie unaczynioną błonę śluzową policzków (Kamimori i in. 2002; Wickham i Spriet 2018). Ustalenie tego jest szczególnie istotne dla sportowców, bowiem efektywniejsze wchłanianie CAF może prowadzić do szybszej poprawy czasu reakcji (R_{time}) i tzw. czujności (ang. *alertness*, zdolność organizmu, a zwłaszcza układu nerwowego, do szybkiego i odpowiedniego reagowania na zmiany w otoczeniu) podczas wysiłku fizycznego, co jest kluczowe dla zdolności wysiłkowych (Grgic 2021). CAF po wchłonięciu równomiernie rozmieszcza się w płynach ustrojowych tkanek organizmu (ang. *tissue water compartments*), lecz nie kumuluje się w organizmie. Ze względu na swój lipofilowy charakter może przenikać przez błony komórkowe – w przeciwieństwie do swoich metabolitów. Stosunek krew-osocze bliski 1 wskazuje na swobodne przemieszczanie się CAF do i z komórek krwi oraz ograniczone jej wiązanie z białkami osocza (Nehlig 2018). CAF ulega wydaleniu przez układ moczowy: około 70% przyjętej doustnie dawki jest odzyskiwane w moczu, z czego 0,5–2% w formie niezmienionej (niezmetabolizowanej) (Nehlig 2018). Warto zauważyć, że około 98% CAF podlega resorpcji w kanalikach nerkowych, co tłumaczy stosunkowo niski poziom wydalania niezmetabolizowanej CAF z moczem.

Dodatkowo 2–7% dawki CAF jest wydalone z kałem w ciągu 48 godzin po przyjęciu, głównie w formie metabolitów CAF (Arnaud 2011; Nehlig 2018).

CAF jest eliminowana zgodnie z kinetyką pierwszego rzędu przy dawkach wynoszących 2–10 mg_{CAF}/kg_{BM}; jej metabolizm pierwszego przejścia jest minimalny, a farmakokinetyka niezależna od drogi podania (Nehlig 2018). W wątrobie CAF ulega procesom demetylacji i utleniania, głównie przy udziale enzymu CYP1A2, a około 81% jest przekształcane w paraksantynę (PRX), metabolit wykazujący podobną do CAF zdolność blokowania receptorów adenozynowych, metabolizowany przez ten sam enzym. Pozostałe metabolity CAF, takie jak teobromina i teofilina, są metabolizowane już przez inne enzymy. Zróżnicowane czynniki, takie jak ciąża, styl życia (np. palenie papierosów), choroby czy środowisko, mogą wpływać na metabolizm CAF (Arnaud 2011; Nehlig 2018). Interesujące jest, że metabolizm CAF uzależniony jest od dawki, co sugerowano w niektórych badaniach *in vivo*, wskazując na jej nieliniowy klirens nerkowy oraz wysycalność w zakresie 70–300 mg (Arnaud 2011; Nehlig 2018). Na farmakokinetykę CAF mogą wpływać takie czynniki, jak: zastosowana dawka, obecność składników pokarmowych w żołądku, dysfunkcje żołądka czy spożycie płynów, które modulują klirens nerkowy i czas półtrwania CAF (Arnaud 2011; Nehlig 2018). Niemniej większość różnic w metabolizmie CAF wynikać może z czynników genetycznych. Maksymalne stężenie CAF w osoczu osiągane jest u ludzi po 30–120 minutach, a okres jej półtrwania wynosi 1,5–10 godzin (Guest i in. 2021). Całkowity klirens CAF i jej głównego metabolitu (PRX) w osoczu jest identyczny (2,07–2,20 mL/min/kg_{BM}). Z kolei stężenie PRX obniża się wolniej niż CAF, co po upływie około 8–10 godzin od spożycia suplementu może manifestować się wyższym stężeniem PRX (Arnaud 2011; Nehlig 2018). Ponadto stężenie CAF w ślinie osiąga 65–85% jej stężenia we krwi, co umożliwia wykorzystanie śliny jako narzędzia do nieinwazyjnego monitorowania zgodności z zaleceniami dotyczącymi spożycia CAF lub abstynencji od niej (Nehlig 2018).

Uwzględniając wpływ enzymu CYP1A2 na metabolizm CAF, warto przyrzeć się ocenie jego aktywności enzymatycznej. Zależy ona bowiem od wielu czynników, zwłaszcza płci, pochodzenia etnicznego czy polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (SNP) (Nehlig 2018). Funkcjonalny polimorfizm genu *CYP1A2* może prowadzić do różnic międzyosobniczych w zakresie aktywności tego enzymu. Obecność allelu A na pozycji –163 (rs762551) jest związana z niższą indukowalnością enzymu w porównaniu z allelem C, co znajduje odzwierciedlenie w stosunku CAF do jej metabolitów po spożyciu CAF (Arnaud 2011; Nehlig 2018; Saunders i in. 2023).

Istotny w omawianej tematyce enzym CYP1A2 występuje głównie w wątrobie, a kontrolowana podaż CAF jest najczęściej stosowaną sondą (substancją używaną do oceny aktywności enzymów) do pomiaru jego aktywności. Tak zwanym złotym standardem pomiaru jest w tym zakresie analiza pozornej szybkości klirensu CAF na podstawie wielokrotnego poboru krwi. Ogólną aktywność enzymatyczną CYP1A2 można także mierzyć, określając stosunek ilościowy PRX do CAF (PRX/CAF RATIO) po kontrolowanej w czasie i dawce podaży CAF (Doude van Troostwijk i in. 2003; Perera i in. 2010, 2011, 2012) w różnych ludzkich matrycach biologicznych (takich jak krew czy ślina) oraz miarach w pojedynczym punkcie czasowym (stężenie w pojedynczym punkcie czasowym – C_t), co koreluje z klirensem. Wnikliwa analiza wyników pomiarów farmakokinetycznych umożliwia rekomendację oznaczania C_t PRX i CAF: (a) we krwi (surowicy lub osoczu) po 2, 4, 3–12 lub 5–7 godzinach po zażyciu CAF; lub (b) w ślinie po 1–2, 2, 5 i 6–10 godzinach po zażyciu CAF (Perera i in. 2011). Niemniej, mimo że większość dotychczasowych badań rzeczywiście stosuje okres 6 godzin oraz analizę PRX/CAF RATIO lub fenotypowanie metaboliczne oparte na CAF, brak jest konsensusu co do takiego podejścia naukowego (Grzegorzewski

i in. 2022). Ponadto zależne od czasu i dawki efekty PRX/CAF RATIO nie zostały dotychczas opisane, chociaż mogą być szczególnie istotne dla fenotypowania – zwłaszcza przy bardzo niskich dawkach CAF (Grzegorzewski i in. 2022). Autorzy analizy systematycznej (Grzegorzewski i in. 2022) wykazali, że mimo zastosowania w licznych badaniach różnych protokołów dawkowania uzyskane wyniki fenotypowania metabolicznego z użyciem CAF były bardzo spójne. Współczynniki korelacji między stężeniem CAF i PRX w ślinie a stężeniem we krwi wyniosły odpowiednio 0,84 i 0,76. Jeszcze wyższą wartość współczynnika korelacji (0,88) wykazano między klirensem CAF opartym na analizie śliny a tym ocenianym we krwi. Dostępne dane literaturowe wskazują zatem na możliwość obliczania klirensu zarówno przy wykorzystaniu pomiarów z krwi, jak i śliny (Grzegorzewski i in. 2022). Podsumowując, podejście do fenotypowania metabolicznego oparte na wykorzystaniu śliny wykazuje wysoką korelację z metodami opartymi na badaniach krwi (co zostało wcześniej potwierdzone w warunkach spoczynkowych – bez wysiłku fizycznego) (Grzegorzewski i in. 2022).

Zrozumienie farmakokinetyki CAF jest kluczowe dla jej skutecznego wykorzystania jako środka ergogenicznego, szczególnie w kontekście różnorodnych aktywności fizycznych. Zastosowanie suplementacji CAF u sportowców generuje pytania dotyczące ilościowego i jakościowego wymiaru efektów ergogenicznych, które mogą być w znacznym stopniu powiązane ze specyfiką wykonywanych wysiłków (Guest i in. 2021). W tym zakresie szczególną uwagę zwraca CrossFit/HIFT (trening funkcjonalny o wysokiej intensywności), obejmujący funkcjonalne, wielozakresowe treningi wykonywane z dużą i zmienną intensywnością, który może poprawiać ogólną sprawność fizyczną (Dexheimer i in. 2019; Feito i in. 2018). Przyjmuje się, że trening CrossFit/HIFT poprawia siłę, pojemność tlenową i beztlenową, moc, skład ciała, a także spoczynkową częstość skurczów serca (HR) oraz ciśnienie krwi (Kapsis i in. 2022). Istnieje kilka wzorcowych testów CrossFit/HIFT, takich jak *Grace*, *Fran* czy *Nancy*, oceniających zdolności wysiłkowe (Dexheimer i in. 2019; Feito i in. 2018). Jednym z takich testów, ostatnio zwalidowanych i opisanych jako precyzyjna metoda oceny zdolności wysiłkowych w CrossFit/HIFT, jest *Fight Gone Bad* (FGB). Ten wysoce specyficzny dla tej dyscypliny test obejmuje kilka kluczowych cech fizjologicznych, takich jak wytrzymałość, siła, szybkość, moc i wydolność tlenowa (Durkalec-Michalski i in. 2021). Niemniej w badaniach, w których oceniano wpływ diety lub suplementacji w CrossFit/HIFT, stosowano różne testy wysiłkowe, co docelowo utrudnia porównanie i przeprowadzenie krytycznej dyskusji dotychczas uzyskanych wyników.

Oprócz oceny fizycznych zdolności wysiłkowych kluczowym elementem w treningach takich jak CrossFit/HIFT jest także aspekt poznawczy, który może znacząco wpływać na efektywność sportowca. Do takich funkcji poznawczych należy uwaga (ang. *attention*), funkcja odpowiedzialna za alokację zasobów na bodźce wewnętrzne lub zewnętrzne, umożliwiającą kontrolę nad procesami myślowymi i reakcjami na otoczenie. Jeden z mechanizmów CAF, opierający się na działaniu antagonistycznym wobec adenozyiny, prowadząc do uwolnienia neuroprzekaźników takich jak dopamina i noradrenalina (Lorenzo Calvo i in. 2021), sprzyja korzystnym zmianom nastroju, zmniejszeniu uczucia zmęczenia oraz zwiększeniu czujności. Takie efekty CAF mogą przynieść korzyści sportowcom na poziomie poznawczym (Lorenzo Calvo i in. 2021). Pozytywne efekty CAF wykazano w badaniach nad szybkością uczenia się, opóźnionym przypominaniem, dokładnością, gotowością do podjęcia wysiłku fizycznego oraz R_{Time} mierzonym za pomocą testu Stroopa i testu szybkiego przetwarzania informacji wzrokowej (Bello i in. 2019; Hogervorst i in. 1999). Ponadto CAF może wpływać na funkcje sensomotoryczne, zwłaszcza w zakresie stabilizacji postawy. Utrzymanie wyprostowanej sylwetki zależy od mechanizmów równowagi, aktywności struktur korowych oraz procesów poznawczych, a zatem CAF, mo-

dulując zdolności poznawcze takie jak percepcja i uwaga, może pozytywnie wpływać na stabilność posturalną (P_{stab}). Nie da się jednak wykluczyć ryzyka zaburzenia równowagi wywołanego zakłóceniami posturalnymi spowodowanymi stymulującym wpływem CAF na wentylację płuc (Briggs i in. 2021).

Indywidualne różnice w odpowiedzi na CAF, zarówno w kontekście jej wpływu na funkcje poznawcze, jak i ergogenicznego działania, mogą być powiązane z genetycznie uwarunkowaną szybkością metabolizmu tego związku (Barreto i in. 2021; Guest i in. 2018; Saunders i in. 2023). Wskazuje się, że SNP rs762551 genu *CYP1A2* może różnicować aktywność enzymu CYP1A2 na trzy genotypy: osoby metabolizujące CAF „szybko” (homozygoty AA), „wolno” (heterozygoty AC) oraz „ultrawolno” (homozygoty CC) (Guest i in. 2018). Nosiciele allelu C (AC, CC) stanowią średnio 54% populacji światowej. Ze względu na większe powinowactwo metabolitów CAF do receptorów adenozynowych sugeruje się również zachodzenie szybszej demetylacji do metabolitów CAF u homozygot AA (Barreto i in. 2021). Może to prowadzić do większych korzyści w zakresie wydolności, wynikających z intensyfikacji odpowiedzi psychofizycznej na suplementację CAF. Z kolei „wolny” lub „ultrawolny” metabolizm CAF, związany z przedłużonym blokowaniem receptorów adenozynowych przez CAF, może – paradoksalnie – negatywnie wpływać na wydolność fizyczną i zdolności wysiłkowe (Guest i in. 2018; Saunders i in. 2023). W zakresie potencjalnej regulacji odpowiedzi organizmu na CAF wskazuje się także na znaczenie genu *ADORA2A*. Jego SNP rs5751876S (trzy genotypy: homozygoty TT i CC oraz heterozygoty CT) może modulować wrażliwość na spożycie CAF, co objawia się m.in. poziomem odczuwanego niepokoju czy przetwarzaniem emocjonalnym (Saunders i in. 2023). Ludzi można podzielić na osoby odznaczające się „wysoką” (TT) lub „niską” (CC, CT) wrażliwością na CAF (Nehlig 2018). Jednak najnowsze dane nie potwierdzają hipotezy, że polimorfizm genu *ADORA2A* wpływa na indukowane podażą CAF różnice w wydolności fizycznej czy zdolnościach wysiłkowych (Saunders i in. 2023).

Pomimo że CAF jest powszechnie stosowanym przez sportowców i osoby aktywne fizycznie suplementem ergogenicznym, a jej farmakokinetyka i farmakodynamika wydają się poddane wnikliwej ewaluacji naukowej, brakuje danych na temat zależnych od dawki indywidualnych zmian wywołanych przez CAF w zakresie specyficznych zdolności wysiłkowych CrossFit/HIFT. Co więcej, dostępne dane dotyczące metabolizmu CAF w warunkach wysiłku fizycznego są ograniczone. Celem niniejszej dysertacji doktorskiej było zatem przeprowadzenie badań obejmujących suplementację różnych dawek CAF i pełniejszą ocenę jej wpływu na specyficzne zdolności wysiłkowe, częstość skurczów serca, subiektywne odczucie zmęczenia, stabilność posturalną, czas reakcji, stężenie mleczanu i pirogronianu we krwi (publikacja 1) oraz zmiany stężenia CAF i PRX, a także PRX/CAF RATIO w surowicy krwi i ślinie w czterech różnych punktach czasowych (publikacja 2) w grupie zdrowych, średnio wytrenowanych osób uczestniczących w treningu CrossFit/HIFT.

2. CELE I HIPOTEZY

Głównym celem badań podjętych w ramach niniejszego projektu doktorskiego była ocena wpływu trzech różnych dawek CAF oraz placebo (*PLA*) na specyficzne zdolności wysiłkowe, częstość skurczów serca, subiektywne odczucie zmęczenia, stabilność posturalną, czas reakcji, stężenie mleczanu i pirogronianu we krwi, zmiany stężenia CAF i PRX oraz PRX/CAF RATIO w surowicy krwi i ślinie w czterech punktach czasowych w grupie zdrowych, średnio wytrenowanych osób uczestniczących w treningu CrossFit/HIFT.

Cele szczegółowe obejmowały ocenę wpływu trzech różnych dawek CAF oraz *PLA* na:

- a) specyficzne zdolności wysiłkowe oceniane za pomocą 17-minutowego testu FGB (publikacja 1);
 - b) częstość skurczów serca monitorowaną za pomocą systemu telemetrycznego Polar (publikacja 1);
 - c) subiektywne odczucie zmęczenia oceniane za pomocą skali Borga (publikacja 1);
 - d) stabilność posturalną ocenianą za pomocą platformy posturograficznej (publikacja 1);
 - e) czas reakcji oceniany za pomocą testu czasu reakcji prostej z baterii Wiedeńskiego Systemu Testów (publikacja 1);
 - f) stężenie mleczanu i pirogronianu we krwi analizowane za pomocą metody fluorometrycznej (publikacja 1);
 - g) zmiany stężenia CAF w surowicy krwi i ślinie, analizowanego za pomocą wysoko-sprawnej chromatografii cieczowej (publikacja 2);
 - h) zmiany stężenia PRX w surowicy krwi i ślinie, analizowanego za pomocą wysoko-sprawnej chromatografii cieczowej (publikacja 2);
 - i) zmiany PRX/CAF RATIO w surowicy krwi i ślinie (publikacja 2);
 - j) aktywność enzymu CYP1A2 mierzona jako średni skorygowany czasowo PRX/CAF RATIO w ślinie (publikacja 2);
- a także:
- k) identyfikację potencjalnych interakcji pomiędzy dawką CAF, wynikami FGB oraz kluczowymi polimorfizmami determinującymi efekty działania CAF [*CYP1A2* (SNP rs762551 A>C) oraz *ADORA2A* (rs5751876 C>T)] (publikacja 1);
 - l) ocenę wpływu dawki CAF oraz polimorfizmu genu *CYP1A2* (rs762551) na aktywność enzymu CYP1A2 (publikacja 2).

Postawiono następujące hipotezy:

1. Ergogeniczny wpływ CAF jest zróżnicowany i zależny od dawki w odniesieniu do wszystkich mierzonych wskaźników (wyższa dawka będzie związana z większym wpływem na zdolności wysiłkowe w FGB, HR, RPE, R_{Time} , P_{Stab} , stężenie *La* i *Pa*).
2. Efekt podaży CAF na zdolności wysiłkowe jest zależny od genotypów *CYP1A2* (homozygoty AA reagują bardziej niż heterozygoty AC oraz homozygoty CC) i *ADORA2A* (homozygoty TT reagują bardziej niż nosiciele allelu C).
3. Wyższe dawki CAF wywołują większe zmiany stężenia CAF i PRX w surowicy krwi i ślinie.

4. Największa zmiana związana ze wzrostem stężenia CAF od poziomu sprzed suplementacji obserwowana jest 60 minut po spożyciu CAF.
5. Wyższa dawka CAF prowadzi do zwiększenia aktywności enzymu CYP1A2.
6. Nosiciele allelu C (w przypadku genotypów *CYP1A2*) odznaczają się większą aktywnością enzymu CYP1A2 w porównaniu z homozygotami AA.

3. CYKL PUBLIKACJI

Niniejszy autoreferat przedstawia w ujęciu syntetycznym treści zawarte i omówione w artykułach opublikowanych w ramach monotematycznego cyklu prac pod wspólnym tytułem *Efekt podaży różnych dawek kofeiny na zdolności wysiłkowe oraz stężenie kofeiny i paraksantyny we krwi i ślinie u osób trenujących CrossFit*. Cykl ten obejmuje następujące artykuły naukowe:

1. Głowska N., Malik J., Podgórski T., Stemplewski R., Maciaszek J., Ciężyńska J., Zawieja E.E., Chmurzynska A., Nowaczyk P.M., Durkalec-Michalski K. (2024) The dose-dependent effect of caffeine supplementation on performance, reaction time and postural stability in CrossFit – a randomized placebo-controlled crossover trial. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 21 (1), 2301384. <https://doi.org/10.1080/15502783.2023.2301384>

punktacja MNiSW: 100; Impact Factor: 4,5; Impact Factor 5-letni: 4,8

2. Głowska N., Malik J., Anioła J., Zawieja E.E., Chmurzynska A., Durkalec-Michalski K. (2024) The effect of caffeine dose on caffeine and paraxanthine changes in serum and saliva and CYP1A2 enzyme activity in athletes: a randomized placebo-controlled crossover trial. *Nutrition & Metabolism*, 21 (1), 90. <https://doi.org/10.1186/s12986-024-00863-3>

punktacja MNiSW: 100; Impact Factor: 3,9; Impact Factor 5-letni: 4,3

Łącznie: punktacja MNiSW: 200; Impact Factor: 8.4¹

W niniejszym autoreferacie zdecydowano się nie zamieszczać tabel oraz rycin ze źródłowych publikacji celem uniknięcia powielania danych zawartych w załączonych do autoreferatu pracach.

¹ Wartość Impact Factor zgodnie z aktualną klasyfikacją na 2023 r.

4. MATERIAŁ I METODY

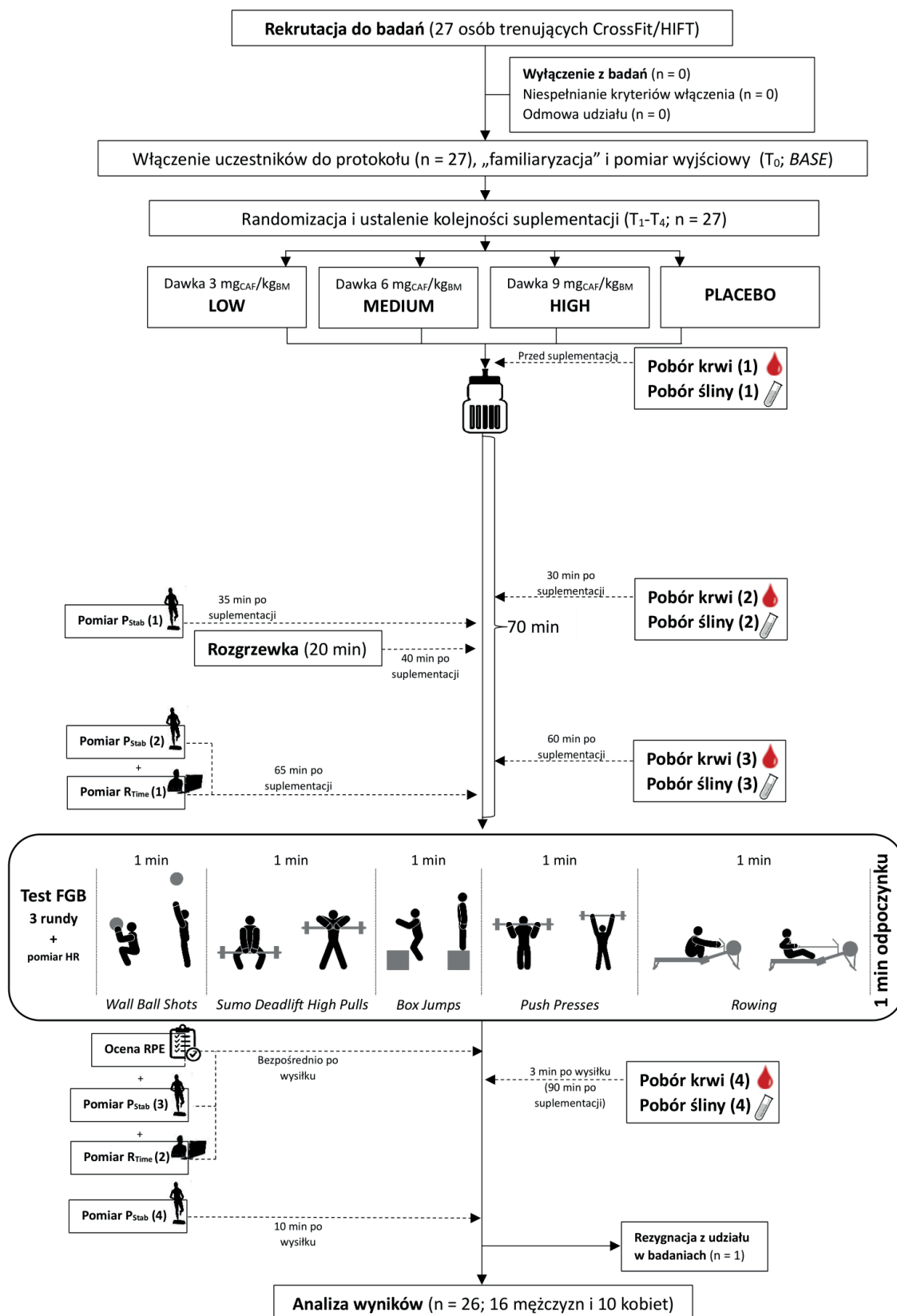
4.1. Schemat badań (publikacje 1 i 2)

Realizowany projekt doktorski obejmował doraźną suplementację trzema dawkami CAF (3, 6, 9 mg_{CAF}/kg_{BM}) lub PLA w randomizowanych, kontrolowanych PLA badaniach krzyżowych z podwójnie ślepą próbą. Protokół badań przewidywał pięć laboratoryjnych wizyt badawczych (T₀–T₄). Po zapoznaniu się z protokołem (tzw. familiaryzacja), zrekrutowani ochotnicy odbyli pierwszą wizytę: T₀, pomiar wyjściowy (*BASE*), bez suplementacji. Po T₀ uczestnicy zostali losowo przypisani (randomizacja na podstawie wyników testu FGB) do kolejności podawania suplementów, zgodnie z przydzielonymi kodami, wyznaczonymi przez niezależnego biostatystyka. Główny protokół badawczy obejmował następnie cztery osobne wizyty (T₁–T₄), podczas których każdorazowo przeprowadzono pomiary antropometryczne wraz z analizą składu ciała, wykonano test specyficznych zdolności wysiłkowych (FGB), pomiar R_{Time} i P_{Stab} oraz pobór materiału biologicznego (próbki krwi i śliny). U poszczególnych uczestników wszystkie testy wykonywano o tej samej porze dnia. Pomiedzy kolejnymi wizytami stosowano 7-dniowy okres tzw. wypłukiwania (ang. *washout*), uwzględniający kinetykę wydalania CAF z organizmu (Magkos i Kavouras 2005). Trzy godziny przed wizytą uczestnicy spożywali posiłek wystandaryzowany stosownie do wcześniejszych badań – węglowodany: 2 g/kg_{BM}, białka: 25 g, woda: 7 mL/kg_{BM} (Durkalec-Michalski i in. 2022, 2023). Badani zostali również zobowiązani do wyłączenia z diety produktów zawierających CAF na 24 godziny przed każdą wizytą badawczą. Dodatkowo uczestnicy zostali podzieleni *post hoc* na grupy według genotypów *CYP1A2* (homozygoty AA oraz nosiciele allelu C) oraz *ADORA2A* (nosiciele allelu C oraz homozygoty TT). Schemat badań został graficznie przedstawiony na rycinie 1.

4.2. Grupa badana (publikacje 1 i 2)

Wstępnie do badań zrekrutowano 27 średnio wytrenowanych osób uprawiających CrossFit/HIFT, będących członkami klubów CrossFit® z Poznania. Ostatecznie 26 z nich (10 kobiet i 16 mężczyzn) ukończyło cały protokół badań i zostało uwzględnionych w docelowych analizach. Kryteria włączenia obejmowały: dobry stan zdrowia, aktualne zaświadczenie lekarskie potwierdzające zdolność do uprawiania sportu, co najmniej 2-letnie doświadczenie w treningu CrossFit/HIFT, odbywanie co najmniej czterech treningów CrossFit/HIFT w tygodniu oraz umiarkowane, codzienne spożywanie produktów zawierających CAF, co odpowiada więcej niż dwóm filiżankom kawy o pojemności 240 mL, gdzie łączna średnia zawartość CAF wynosi około 170 mg (120–240 mg) (Nieber 2017).

W badaniach uwzględniono zarówno kobiety, jak i mężczyzn, ze względu na udział osób obu płci w treningach CrossFit/HIFT, jak i podkreślaną w wielu ostatnich publikacjach konieczność częstszego uwzględnienia udziału kobiet podczas interwencji suplementacyjnych prowadzonych w grupie sportowców (Anderson i in. 2023; Larrosa i in. 2024). Protokół badań przeprowadzono w kilku okresach, od lipca 2021 r. do grudnia 2022 r. w Zakładzie Dietetyki Sportowej AWF Poznań. Wszyscy uczestnicy zobowiązali się do utrzymania dotychczasowego stylu życia, przestrzegania indywidualnego planu



BASE – pomiar wyjściowy; BM – masa ciała; CAF – kofeina; FGB – test *Fight Gone Bad*; HIFT – trening funkcjonalny o wysokiej intensywności; HIGH – wysoka dawka CAF; HR – częstość skurczów serca; LOW – niska dawka CAF; MEDIUM – średnia dawka CAF; P_{Stab} – stabilność posturalna; RPE – subiektywne odczucie zmęczenia; R_{Time} – czas reakcji; T₀₋₄ – kolejność wizyt badawczych

Rycina 1. Graficzny schemat badań

treningowego, diety czy suplementacji podczas realizacji protokołu badań oraz odpowiedniego przygotowania do każdej wizyty badawczej w ten sam sposób, zwracając uwagę zwłaszcza na okres 24 godzin przed wizytą.

Projekt badawczy został pozytywnie zaopiniowany przez Komisję Bioetyczną przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (numer referencyjny 196/21 z dnia 8 kwietnia 2021 r.) i zarejestrowany prospektywnie na *ClinicalTrials.gov* (NCT03822663). Przyjęta metodyka badań spełniła wymogi oświadczenia CONSORT dla badań randomizowanych. Każdy z uczestników badań wyraził pisemną i świadomą zgodę na swój udział w protokole. Wszelkie procedury przeprowadzono zgodnie z normami etycznymi Deklaracji helsińskiej z 2013 r.

4.3. Protokół suplementacyjny (publikacje 1 i 2)

W procedurze eksperymentalnej, w schemacie krzyżowym, każdemu uczestnikowi podano doraźną dawkę CAF w ilości 3 mg (*LOW*), 6 mg (*MEDIUM*) lub 9 mg (*HIGH*) na kilogram masy ciała lub *PLA*: 4 interwencje suplementacyjne (podaż trzech dawek CAF oraz *PLA*), 1 *BASE* (bez suplementacji). Dawki CAF (czysta kofeina farmaceutyczna, Ostrovit, Polska) oraz *PLA* (gorzki aromat) rozpuszczono w 20 mL 100-procentowego soku pomarańczowego (Tymbark) i 80 mL wody, aby zniwelować gorzki posmak. W trakcie wizyt badawczych suplementy były przyjmowane 70 minut przed testem FGB, bezpośrednio po pierwszym pobraniu krwi. Preparaty podawano każdemu uczestnikowi w pojemnikach oznaczonych unikatowym kodem. Zgodnie z zalecaną procedurą zaślepienia preparaty zostały przygotowane z wyprzedzeniem przez badacza, który nie brał bezpośredniego udziału w przeprowadzaniu eksperymentu. W ramach podwójnego zaślepienia członkowie zespołu badawczego i uczestnicy nie znali rodzaju interwencji (czy podawano CAF, czy *PLA*). Szczegóły randomizacji były zanonimizowane i ujawnione dopiero po zakończeniu całego protokołu. Preparaty podawano w ściśle określonym czasie przed testem wysiłkowym, a zgodność z zaleceniami dotyczącymi ich spożycia była kontrolowana przez badaczy.

4.4. Pomiar wskaźników antropometrycznych i składu ciała (publikacje 1 i 2)

Pomiary antropometryczne przeprowadzano na początku każdej wizyty badawczej, celem zapewnienia powtarzalnych warunków dla procedur testowych. Przed analizą składu ciała dwukrotnie mierzono masę i wysokość ciała przy użyciu skalibrowanej wagi ze stadiometrem (WPT 60/150 OW, Radwag®, Radom, Polska). Całkowitą zawartość wody w organizmie oceniano za pomocą bioimpedancji elektrycznej z wykorzystaniem urządzenia Bodystat 1500 (Bodystat Inc., Douglas, Wielka Brytania) (tabela 1). Testy przeprowadzono wyłącznie u uczestników odpowiednio nawodnionych. W trakcie pomiaru bioimpedancji ściśle przestrzegano zalecanych warunków pomiarowych (Kyle i in. 2004).

Tabela 1. Charakterystyka wskaźników antropometrycznych i składu ciała badanej grupy (n = 26)

Wskaźnik	Średnia $\pm$ SD
Wiek [lata]	35,4 $\pm$ 6,5
Masa ciała [kg]	77,4 $\pm$ 16,6
Wysokość ciała [cm]	175 $\pm$ 9
Całkowita zawartość wody [%; L]	57,2 $\pm$ 5,1; 44,1 $\pm$ 9,7
Tkanka tłuszczowa [%; kg]	19,9 $\pm$ 5,6; 15,5 $\pm$ 6,1
Beztłuszczowa masa ciała [%; kg]	80,1 $\pm$ 5,7; 61,9 $\pm$ 13,6

n – liczba uczestników; SD – odchylenie standardowe

4.5. Ocena sposobu żywienia (publikacje 1 i 2)

Podczas wizyty T_0 każdy uczestnik wypełnił kwestionariusz przygotowany na potrzeby badań, dotyczący zwyczajowego spożycia CAF. Dzielne spożycie CAF obliczono na podstawie rekomendowanej bazy danych (Nieber 2017). Dodatkowo, za pomocą kwestionariusza, oceniono stosowanie suplementów zawierających CAF oraz ewentualne skutki uboczne po ich spożyciu, aby spełnić kryteria włączenia uczestników do badań. Ocena diety, ze szczególnym uwzględnieniem 24-godzinnej abstynencji od produktów zawierających CAF, została przeprowadzona przy wykorzystaniu metody bieżącego notowania (dzienniczek żywieniowy z okresu dwóch kolejnych dni przed każdą wizytą badawczą). Uczestnicy zostali przeszkoleni z metody rejestrowania diety przez dietetyka podczas wizyty T_0 . Dzienniczki poddano analizie ilościowej za pomocą oprogramowania dietetycznego, które wykorzystuje bazę danych opracowaną przez Instytut Żywności i Żywienia w Warszawie (oprogramowanie Kcalmar.pro, Lublin, Polska) (tabela 2).

Tabela 2. Charakterystyka sposobu żywienia badanej grupy (n = 26)

Wskaźnik	Średnia $\pm$ SD
Pobór energii [kcal; kcal/kg _{BM}]	2362 $\pm$ 653; 31,0 $\pm$ 9,4
Węglowodany [g; g/kg _{BM}]	281 $\pm$ 89; 3,1 $\pm$ 1,2
Białka [g; g/kg _{BM}]	125 $\pm$ 42; 1,6 $\pm$ 0,5
Tłuszcze [g; g/kg _{BM}]	84 $\pm$ 28; 1,1 $\pm$ 0,4
Codzielne zwyczajowe spożycie CAF [mg/day]*	231 $\pm$ 121

BM – masa ciała; n – liczba uczestników; SD – odchylenie standardowe

* codzielne spożycie, z wyłączeniem dnia wizyty badawczej oraz 24 godzin poprzedzających wizytę

4.6. Ocena specyficznych zdolności wysiłkowych za pomocą testu *Fight Gone Bad* wraz z monitoringiem częstości skurczów serca i oceną subiektywnego odczucia zmęczenia (publikacja 1)

Do oceny specyficznych zdolności wysiłkowych uczestników wybrano test FGB, który jest uznawany za jeden z wzorcowych testów HIFT ze względu na pomiar specyficznych dla CrossFit/HIFT zdolności wysiłkowych. Test ten przeprowadzono zgodnie z protokołem opisanym w poprzednich badaniach (Durkalec-Michalski i in. 2018, 2022), a jego powta-

rzalność oceniono jako wysoką (Durkalec-Michalski i in. 2021). Wszyscy uczestnicy każdorazowo wykonywali 20-minutową indywidualną rozgrzewkę tuż przed rozpoczęciem testu. Cały test trwał 17 minut: [3 rundy (R_{1-3}) $\times$ 5 min] oraz [2 przerwy $\times$ 1 min pomiędzy rundami]. Każda runda obejmowała pięć następujących ćwiczeń:

- *Wall Ball Shots* – rzuty piłką lekarską (o masie 9 kg dla mężczyzn lub 6 kg dla kobiet) do tarczy umieszczonej na wysokości 3 m dla mężczyzn lub 2,7 m dla kobiet, z pozycji przysiadu, następnie złapanie piłki w górnej fazie wyprostu nóg i powrót do przysiadu;
- *Sumo Deadlift High Pulls* – podnoszenie sztangi (o masie 35 kg dla mężczyzn lub 25 kg dla kobiet) na wysokość barków; ćwiczący w lekkim rozkroku pochyla się po sztangę umieszczoną na ziemi, utrzymując proste plecy; przy każdym powtórzeniu należy odłożyć sztangę do pozycji wyjściowej;
- *Box Jumps* – naskok obiema nogami na skrzynię o wysokości 60 cm dla mężczyzn lub 50 cm dla kobiet, następnie zeskok obiema nogami na podłogę;
- *Push Presses* – wypychanie sztangi (o masie 35 kg dla mężczyzn lub 25 kg dla kobiet) nad głowę, wychodząc z lekko ugiętych kolan; w przerwach między wypychaniem sztanga znajduje się na wysokości barków, po osiągnięciu maksymalnej wysokości sztangi należy zablokować ramiona w barkach oraz łokciach;
- *Rowing* – ćwiczenie wykonywane na ergometrze wioślarskim Concept.

Uczestnicy mieli wykonać jak najwięcej powtórzeń (lub „kilokalorii” wskazywanych na monitorze ergometru wioślarskiego) każdego ćwiczenia w ciągu jednej minuty, a następnie natychmiast przejść do kolejnego ćwiczenia. Każde prawidłowe powtórzenie wymagało pełnego i zgodnego z techniką zakresu ruchu charakterystycznego dla danego ćwiczenia. Wynik tego testu wysiłkowego stanowiły: (a) całkowita liczba wszystkich powtórzeń wykonanych podczas testu FGB (FGB_{Total}); (b) liczba powtórzeń wykonanych w poszczególnych rundach; oraz (c) liczba powtórzeń poszczególnych ćwiczeń w ramach pojedynczych rund FGB. Procedury testowe były oceniane w czasie rzeczywistym przez dwóch niezależnych członków zespołu badawczego i dodatkowo rejestrowane wizualnie. Podczas testu udzielano werbalnego wsparcia oraz odtwarzano muzykę w tle.

Ponadto w trakcie badań prowadzono stały monitoring HR za pomocą systemu telemetrycznego (Polar, Finlandia), co pozwoliło na wyznaczanie średniej (HR_{mean}) i maksymalnej częstości skurczów serca (HR_{max}). Na koniec testu FGB uczestnicy dokonywali oceny subiektywnego odczucia zmęczenia (RPE) za pomocą skali Borga (6–20), zgodnie z opublikowanymi zaleceniami (Borg 1998; Durkalec-Michalski i in. 2019).

4.7. Pomiar czasu reakcji (publikacja 1)

Pomiar R_{Time} przeprowadzono dwukrotnie podczas każdej wizyty badawczej (po raz pierwszy – 65 minut po suplementacji, przed FGB; po raz drugi – bezpośrednio po FGB) przy użyciu Wiedeńskiego Systemu Testów (Schuhfried GmbH, Austria; polski dystrybutor COGNIFIC). To narzędzie jest powszechnie stosowane i zalecane w badaniach funkcji poznawczych u sportowców (Baláková i in. 2015). Uczestnicy badań reagowali najszybciej, jak to możliwe, na sygnały optyczne. Zadanie S1 wybrane do badania R_{Time} z baterii Wiedeńskiego Systemu Testów dotyczyło pojedynczego bodźca, trwało 4 minuty i polegało na naciśnięciu przycisku w momencie pojawienia się prostego żółtego sygnału świetlnego. Uczestnik używał tylko jednego palca dominującej ręki. Aby ujednolicić pomiary, każde podejście poprzedzone było krótkim testem próbnym, po którym uczestnik wykonywał test główny trwający 4 minuty. Wiedeński System Testów umożliwia określenie R_{Time} z dokładnością do tysięcznych części sekundy i wiarygodną ocenę R_{Time} na pojawiający się bodziec. Pomiar

R_{Time} wykonywano za pomocą panelu reakcji – jednego z urządzeń reakcyjnych Wiedeńskiego Systemu Testów, z przyciskiem „odpoczynek” i przyciskiem „reakcja” umożliwiającymi rozdzielenie zmiennych na czas reakcji (R_{Time}) i czas motoryczny (M_{Time}). Termin R_{Time} określa czas pomiędzy prezentacją bodźca a wystąpieniem odpowiedzi, co w teście oznaczało podniesienie palca z przycisku „odpoczynek”. Z kolei M_{Time} określa czas między podniesieniem palca z przycisku „odpoczynek” a naciśnięciem przycisku „reakcja”. Ponadto analizowano zmienność wskaźników R_{Time} i M_{Time} .

4.8. Pomiar stabilności posturalnej (publikacja 1)

Pomiar P_{Stab} oceniano czterokrotnie (po raz pierwszy – 35 minut po suplementacji, przed rozgrzewką; po raz drugi – 65 minut po suplementacji, przed testem FGB; po raz trzeci – bezpośrednio po teście FGB; po raz czwarty – 10 minut po teście FGB) podczas każdej wizyty badawczej, wykorzystując platformę posturograficzną AccuGait™ (model AMTI PJB-101, AMTI, Watertown, MA, USA) z oprogramowaniem Balance Trainer i częstotliwością próbkowania 100 Hz. Platforma pozwala monitorować zmiany w siłach reakcji podłoża i na tej podstawie oceniać pozycję oraz oscylację środka siły nacisku stóp (COP). Platforma na czas prowadzonych badań była umieszczona na płaskiej twardej powierzchni, a uczestnicy podczas pomiarów stali na niej boso. Każdorazowo przed rozpoczęciem testu wydawano te same instrukcje: „Proszę stanąć swobodnie na platformie – na jednej nodze, ręce wzdłuż tułowia, oczy otwarte, wzrok skierowany przed siebie” (Bonnet 2016). Uczestnicy stali na nodze dominującej, którą wcześniej określano poprzez pytanie: „Gdybyś miał kopnąć piłkę do celu, której nogi byś użył?”. Odpowiedź wskazywała na dominację nogi zarówno w zadaniu mobilizacyjnym, jak i stabilizacyjnym (van Melick i in. 2017). Każdy test trwał 30 sekund. Prędkość przemieszczania się środka siły nacisku stóp (V_{COP}) oraz obszar obejmujący 95% ścieżki przemieszczeń środka siły nacisku stóp (Area95) były analizowane jako wskaźniki P_{Stab} .

4.9. Pobór i analiza materiału biologicznego (publikacje 1 i 2)

Krew włośniczkową (publikacje 1 i 2) oraz ślinę (publikacja 2) pobierano w czterech punktach czasowych: po raz pierwszy – przed suplementacją (0'), po raz drugi – 30 minut po suplementacji (30'), po raz trzeci – 60 minut po suplementacji (60', przed FGB), po raz czwarty – 90 minut po suplementacji (90', 3 minuty po FGB). Próbkę pobierano podczas każdej wizyty badawczej. Wszystkie próbki były pobierane przez wykwalifikowanego pracownika medycznego, a uczestnicy znajdowali się w pozycji siedzącej wyprostowanej. Próbkę krwi włośniczkowej pobierano z opuszki palca ręki niedominującej za pomocą jednorazowego nakłuwacza Medlance® Red (HTL-STREFA, Łódź, Polska) o ostrzu 1,5 mm i głębokości penetracji 2,0 mm.

Publikacja 1: próbki krwi (50 μ L) pobierano i natychmiast przenoszono do mikrotub zawierających 250 μ L kwasu nadchlorowego o stężeniu 0,6 M. Publikacja 2: próbki krwi (600 μ L) pobierano do dwóch probówek Microvette® CB 300 Serum CAT (Sarstedt, Nümbrecht, Niemcy) z aktywatorem krzepnięcia, a następnie oddzieloną przez wirowanie surowicę wykorzystywano do pomiaru stężenia CAF i PRX. Dodatkowo próbki śliny (1 mL) pobierano w tych samych punktach czasowych co próbki krwi, za pomocą specjalnych pojemników na ślinę (wacik Salivette®; Sarstedt, Nümbrecht, Niemcy) zgodnie z instrukcjami producenta (wacik wyjmowano z probówki Salivette®, umieszczano

w ustach i żuto około 60 sekund w celu stymulacji wydzielania śliny, następnie wacik z zebraną śliną wkładano z powrotem do probówki i zamykano zatyczkę). Ślinę ekstrahowano przez wirowanie przez 2 minuty przy $1000 \times g$. Zebrane próbki surowicy krwi oraz śliny zamrażano i przechowywano w temperaturze -80°C do czasu przeprowadzenia dalszych analiz.

4.9.1. Analiza stężenia mleczanu i pirogronianu (publikacja 2)

Pomiar stężenia mleczanu (La) i pirogronianu (Pa) przeprowadzono we krwi zgodnie z metodą fluorometryczną opisaną przez Maughana i in. (1982). Metoda ta była wielokrotnie wykorzystywana przez zespół naukowy, do którego należy autorka niniejszego projektu doktorskiego (Durkalec-Michalski i in. 2018, 2024).

4.9.2. Analiza stężenia kofeiny i paraksantyny (publikacja 2)

Stężenie CAF i PRX w surowicy krwi i ślinie ($\mu\text{g/mL}$) oznaczano po ekstrakcji ciecz–ciecz za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), zgodnie z wcześniej opisaną metodyką (Perera i in. 2010; Zawieja i in. 2023). Pomiarów dokonano za pomocą analizatora HPLC Hitachi Lachom 7000 (Merck, Darmstadt, Niemcy) z kolumną LiChro-CART® 250-4 (LiChrospher® 100, RP-18, 5 μm , Merck, Darmstadt, Niemcy). Fazę mobilną stanowiła mieszanina acetonitryl–kwas octowy–woda (100 : 1 : 899). CAF, PRX oraz standard wewnętrzny (benzotriazol) były ilościowo oznaczane za pomocą detekcji UV przy długości fali 280 nm. Przy przepływie eluentu 1 mL/min czasy retencji wynosiły 14 minut (CAF) i 7 minut (PRX). Dodatkowo obliczono PRX/CAF RATIO, dzieląc stężenie PRX przez stężenie CAF.

4.9.3. Analiza aktywności enzymu CYP1A2 (publikacja 2)

Aktywność enzymu CYP1A2 oceniono poprzez wyznaczenie średniego, skorygowanego o czas współczynnika PRX/CAF RATIO w ślinie. Wcześniejsze analizy wykazały, że PRX/CAF RATIO w ślinie mierzony 6 godzin po spożyciu CAF wykazuje najlepszą korelację z klirensem, co zapewnia najbardziej wiarygodną walidację aktywności enzymu CYP1A2 (Fuhr i in. 1996; Fuhr i Rost 1994). Ze względu na cztery różne punkty czasowe pobierania próbek w niniejszym projekcie doktorskim oraz stosunkowo krótki czas trwania wizyt badawczych wybrano metodę opisaną wcześniej przez Urry i in. (2016), która umożliwiła oszacowanie aktywności enzymu CYP1A2 poprzez dostosowanie wartości współczynnika PRX/CAF RATIO do optymalnego i najczęściej stosowanego momentu poboru próbek (6 godzin po suplementacji). W tej metodzie zastosowano równanie zaczerpnięte z badania Spigseta i in. (1999), aby oszacować PRX/CAF RATIO (y), jeśli znany był przedział czasowy między przyjęciem CAF a pobraniem próbki (x). Ustalono, że przedział czasowy wynoszący 6 godzin odpowiada średniemu współczynnikowi PRX/CAF równemu 0,725 (Urry i in. 2016).

$$y = 0,016 + (0,141 \times x) + (-0,004 \times x^2)$$

Zgodnie z instrukcją: (1) „rzeczywisty” PRX/CAF RATIO obliczono na podstawie molarnego stężenia CAF i PRX, następnie (2) oszacowano „referencyjny” średni PRX/CAF

RATIO, zgodnie z opisanym wcześniej postępowaniem, (3) obliczono różnicę między „rzeczywistym” a „referencyjnym” PRX/CAF RATIO, (4) średni, skorygowany o czas PRX/CAF RATIO, zakładający idealny odstęp czasowy wynoszący 6 godzin, określono przez dodanie 0,725 do różnicy wyliczonej w kroku 3. W kroku 2, jako x w równaniu, założono odstęp czasowy z trzeciego punktu czasowego (60 minut po suplementacji), ponieważ zgodnie z konsensusem dotyczącym suplementacji CAF w sporcie zaleca się jej przyjęcie na 60 minut przed wysiłkiem z powodu oczekiwanego najwyższego stężenia w tym momencie (Guest i in. 2021).

4.9.4. Analiza polimorfizmów pojedynczych nukleotydów *CYP1A2* i *ADORA2A* (publikacje 1 i 2)

Wymazy z policzka do dalszego genotypowania *CYP1A2* (rs762551) (publikacje 1 i 2) oraz *ADORA2A* (rs5751876) (publikacja 1) pobrano podczas T_0 . Uczestnikom polecono włożyć wymazówkę do ust i energicznie pocierać wewnętrzną stronę policzka lub obszar pod dolną i górną wargą przez 1 minutę. DNA wyizolowano ze złuszczonych komórek nabłonka policzkowego za pomocą standardowego zestawu (EXTRACTME® Genomic DNA Kit EM13, Blirt SA, Polska). Genotypowanie przeprowadzono zgodnie z wcześniej opisaną metodą za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (real-time PCR) (Zawieja i in. 2023), stosując komercyjne zestawy do genotypowania SNP TaqMan® (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA, ID C__8881221_40 i C__2446672_50) na aparacie LightCycler 480 (Roche Diagnostics, Szwajcaria). Wyniki genotypowania zostały przedstawione w tabeli 3.

Tabela 3. Charakterystyka podziału badanej grupy według genotypów (n = 26)

Wskaźnik	Średnia ±SD
Genotyp <i>ADORA2A</i>	n
„Wysoka” wrażliwość na CAF	4 TT
„Niska” wrażliwość na CAF	22 (10 CC, 12 CT)
Genotyp <i>CYP1A2</i>	n
„Szybki” metabolizm CAF	6 AA
„Wolny” metabolizm CAF	20 (3 CC, 17 AC)

n – liczba uczestników; SD – odchylenie standardowe

4.10. Analiza statystyczna (publikacje 1 i 2)

Publikacje 1 i 2

Do obliczenia minimalnej liczby uczestników wymaganej do uzyskania mocy większej niż 0,8 przy założonym poziomie błędów alfa 0,05 użyto oprogramowania G*Power (wersja 3.1.9.6, Niemcy). Dla potrzeb niniejszego projektu badawczego zastosowano szacowanie minimalnej wielkości próby dla testu F – ANOVA dla powtarzanych pomiarów (ANOVA RM, czynniki wewnątrzgrupowe). Na podstawie danych z przeglądu parasolowego (Grgic i in. 2020) dotyczących wytrzymałości tlenowej i mięśniowej oszacowano umiarkowaną wielkość efektu (ES): $f(U) = 0,38$. Przy użyciu ES, jednej grupy, pięciu punktów pomiarowych, korekty niesferyczności ϵ równej jeden i opcji „jak w SPSS” analiza wskazała,

że do zminimalizowania błędów I i II rodzaju wystarczająca będzie próba składająca się z 23 uczestników. Dla ANOVA Friedmana oszacowano liczbę uczestników na 26, uwzględniając konieczność zwiększenia próby o 15%. Analizę przeprowadzono z wykorzystaniem programu Statistica 13.3 (TIBCO Software Inc. 2017, USA) oraz RStudio (Posit Software, PBC 2009–2023, USA), z wykorzystaniem pakietu Desc Tools (Signorell i in. 2024).

Publikacja 1

Normalność rozkładu zmiennych została przetestowana przez porównanie wartości skośności i kurtozy z błędami standardowymi tych wartości (wartość skośności lub kurtozy przekraczająca 1,96 błędu standardowego dla próby mniejszej niż 50 uczestników jest uznawana za niespełniającą warunku normalności) (Kim 2013). Porównania między średnimi przeprowadzono za pomocą ANOVA RM (przy spełnieniu warunku normalności) lub ANOVA Friedmana (przy braku spełnienia warunku normalności). Porównania *post hoc* wykonano przy użyciu testu Bonferroniego lub porównań parami testem Wilcoxon, w zależności od tego, czy warunek normalności był spełniony. Wykonano także test sferyczności Mauchly'ego w celu sprawdzenia równości wariancji na różnych poziomach. W przypadku odrzucenia hipotezy spełnienia warunku sferyczności zastosowano korektę Greenhouse'a–Geissera. Za statystycznie istotną wartość przyjęto $\alpha < 0,05$. Wartość ES (wyrażone jako cząstkowa eta kwadrat) interpretowano następująco: $<0,01$ – brak efektu; $<0,06$ – mały efekt; $<0,14$ – średni efekt; $\geq 0,14$ – duży efekt. Z kolei wartości współczynnika W Kendalla interpretowano w następujący sposób: $<0,1$ – brak efektu; $<0,3$ – mały efekt; $<0,5$ – średni efekt; $\geq 0,5$ – duży efekt. Dodatkowo przeprowadzono analizę korelacji między wynikami R_{Time} , M_{Time} , V_{COP} i Area95 po teście wysiłkowym a zmiennymi RPE, $\text{FGB}_{\text{Total}}$ oraz HR_{max} przy użyciu współczynnika korelacji rho Spearmana.

Publikacja 2

Zastosowano test Shapiro–Wilka w celu sprawdzenia założenia normalności. Analiza danych obejmowała zarówno surowe dane: stężenie CAF i PRX uzyskane bezpośrednio w trakcie pomiarów, czyli dane, które nie zostały przetworzone, przeliczone czy znormalizowane (0', 30', 60', 90'), jak i zmiany stężenia CAF i PRX obliczone na podstawie różnicy między pierwszym pomiarem stężenia, czyli przed spożyciem suplementu (0'), a kolejnymi pomiarami (30', 60', 90'). Do analizy surowych danych wykorzystano analizę korelacji, regresję wielomianową oraz analizę różnic między zmiennymi zależnymi (test t-Studenta lub test Wilcoxon). Ogólny model liniowy (GLM) użyto do analizy różnic między zmianami zmiennych. Zastosowano także analizy korelacji Pearsona i Spearmana, aby zweryfikować zależność między stężeniem (CAF, PRX lub PRX/CAF RATIO) w surowicy krwi i ślinie. Regresja wielomianowa została przeprowadzona dla różnic w stężeniu CAF i PRX między próbkami surowicy i śliny, ale nie dla PRX/CAF RATIO, ze względu na brak dopasowania modelu. Dla korelacji surowych danych, analizy różnic oraz regresji wielomianowej porównano 520 wartości (bez dzielenia danych na grupy według dawki). GLM uwzględnił dwa czynniki wewnątrzgrupowe [dawka: D (LOW, MEDIUM, HIGH, PLA)]; punkt czasowy: TP (30', 60', 90')] oraz jeden czynnik międzygrupowy [CYP1A2: C (osoby metabolizujące CAF „szybko” i „wolno”)]. Analizowano także interakcje D*TP i D*TP*C. Jeśli warunek sferyczności nie był spełniony, zastosowano korekcję Huynha–Feldta. Istotne wyniki GLM poddano dalszej analizie porównań parami Bonferroniego. Poziom istotności statystycznej ustalono dla $\alpha < 0,05$. Dodatkowa analiza GLM została przeprowadzona na przekształconych danych, uwzględniając prognozowane stężenia 6 godzin po spożyciu suplementu. W tym celu dane przekształcono z $\mu\text{g/mL}$ na $\mu\text{mol/L}$, zakładając masę molową PRX wynoszącą 180 g/mol oraz CAF – 194 g/mol.

5. WYNIKI

5.1. Specyficzne dla CrossFit/HIFT zdolności wysiłkowe oceniane w teście *Fight Gone Bad* wraz z monitoringiem częstości skurczów serca i oceną subiektywnego odczucia zmęczenia (publikacja 1)

Szczegółowe wyniki testu FGB, HR oraz RPE w formie tabelarycznej i graficznej przedstawiono w publikacji 1 (tabela 2, rycina 2).

Po zażyciu każdej z podawanych dawek CAF obserwowano istotną statystycznie większą liczbę powtórzeń w FGB_{Total} w porównaniu z *BASE* ($p < 0,01$). Nie stwierdzono jednak znaczących różnic zarówno pomiędzy poszczególnymi dawkami CAF, jak i w odniesieniu do *PLA*, choć dawka *MEDIUM* ujawniła zauważalną z praktycznego i sportowego punktu widzenia skuteczność w poprawie wyników FGB_{Total} . Ponadto największą liczbę powtórzeń ($p < 0,01$) w R_1 stwierdzono po dawkach *MEDIUM* i *HIGH* w porównaniu z *BASE* i *PLA*. W R_2 i R_3 liczba powtórzeń była większa ($p < 0,01$) we wszystkich interwencjach w porównaniu z *BASE*, z czego w R_2 najwięcej powtórzeń odnotowano po dawce *MEDIUM*.

Nie stwierdzono istotnych różnic HR_{mean} , HR_{max} ani RPE pomiędzy wszystkimi dawkami CAF a *PLA* w całym protokole badań. Jednak w porównaniu z *BASE* jedynie wartość HR_{mean} była istotnie wyższa ($p = 0,03$) po podaniu dawek *LOW* i *HIGH*.

Przeprowadzona analiza efektu praktyki dla FGB_{Total} wykazała istotny wpływ praktyki (kolejność wizyt) na liczbę powtórzeń w tym teście wysiłkowym: $F(1,83; 48,56) = 33,25$, $p < 0,05$, $\eta = 0,57$.

5.2. Czas reakcji i stabilność posturalna (publikacja 1)

Szczegółowe wyniki czasu reakcji i stabilności posturalnej w formie tabelarycznej przedstawiono w publikacji 1 (tabela 5).

Najkrótszy R_{Time} przed i po FGB zaobserwowano po dawce *MEDIUM*, ale istotność statystyczną w zakresie krótszego ($p = 0,04$) R_{Time} stwierdzono jedynie przed FGB po dawce *HIGH* w porównaniu z *BASE*. Ponadto jedynie po dawce *MEDIUM* zaobserwowano brak istotnego pogorszenia wyników ($p = 0,07$) zmienności R_{Time} między pomiarem przed i po FGB. Najkrótszy M_{Time} przed FGB zaobserwowano po dawce *HIGH*, a po FGB w *BASE*, jednak różnice między dawkami CAF a *PLA* nie były istotne. Ponadto najmniejszą zmienność M_{Time} przed i po FGB zaobserwowano po dawce *MEDIUM*. Istotna zmiana ($p < 0,05$) między pomiarem przed i po FGB w M_{Time} oraz zmienności M_{Time} wystąpiła we wszystkich interwencjach, ale nie w *BASE*.

Wartości V_{COP} i Area95 różniły się istotnie ($p < 0,01$) między punktami czasowymi w każdej dawce CAF, *PLA* i *BASE*. Ponadto największy Area95 i V_{COP} zanotowano bezpośrednio po FGB, jednak bez istotnych statystycznie różnic pomiędzy dawkami CAF, *PLA* oraz *BASE*. V_{COP} w 35 minut po suplementacji była istotnie większa ($p < 0,01$) we wszystkich dawkach CAF i *BASE* w porównaniu z *PLA*, a dawka *LOW* charakteryzowała się mniejszą V_{COP} niż *MEDIUM*.

5.3. Korelacje pomiędzy wynikami testu *Fight Gone Bad*, częstością skurczów serca, subiektywnym odczuciem zmęczenia, czasem reakcji i stabilnością posturalną (publikacja 1)

Szczegółowe wyniki w zakresie analizy korelacji pomiędzy wybranymi badanymi wskaźnikami przedstawiono w formie tabelarycznej w publikacji 1 (tabela 6).

Zaobserwowano niskie dodatnie korelacje między HR_{max} a: (a) V_{COP} bezpośrednio po FGB, (b) Area95 bezpośrednio po FGB, (c) zmiennością M_{Time} bezpośrednio po FGB, (d) różnicą w Area95 (różnica między wynikiem bezpośrednio po i 10 minut po FGB) – co wskazuje na pogorszenie się przedstawionych wyników wraz ze wzrostem HR_{max} . Ponadto stwierdzono niskie/umiarkowane ujemne korelacje między RPE a Area95 (różnica między wynikiem bezpośrednio po FGB) oraz między FGB_{Total} a: (a) R_{Time} po FGB, (b) zmiennością R_{Time} po FGB, (c) M_{Time} po FGB, (d) zmiennością M_{Time} po FGB – co oznacza, że wzrost FGB_{Total} i RPE wiązał się z poprawą wskazanych wartości skorelowanych. Sugeruje się, że większe zmienności P_{Stab} (V_{COP} i Area95) oznaczają gorszą całkowitą P_{Stab} , z kolei większe zmienności R_{Time} i M_{Time} wskazują na dłuższy R_{Time} .

Specyficzna sekwencja zdarzeń (przeprowadzenie testów trzeciego i czwartego bezpośrednio po FGB) pozwala spekulować, że zaobserwowane korelacje mogą mieć charakter przyczynowo-skutkowy.

5.4. Stężenie mleczanu i pirogronianu (publikacja 1)

Szczegółowe wyniki stężenia mleczanu i pirogronianu w formie tabelarycznej przedstawiono w publikacji 1 (tabela 3).

We wszystkich dawkach CAF lub PLA stężenia La i Pa wzrosły od pierwszego do czwartego poboru krwi. Najwyższe stężenie La po FGB odnotowano po dawce *HIGH*. Po wszystkich dawkach CAF stężenie La po FGB było istotnie wyższe w porównaniu z PLA i BASE ($p < 0,01$). Analizując różnice między dawkami CAF, istotnie wyższe stężenie La po FGB zaobserwowano po dawce *HIGH* w porównaniu z *LOW* ($p < 0,01$). Nie odnotowano istotnych statystycznie różnic w przypadku stężenia Pa .

5.5. Stężenie kofeiny i paraksantyny (publikacja 2)

Analiza korelacji między surowymi wynikami z 0' a zmianami w 30', 60' i 90' wykazała istotność jedynie w BASE dla stężenia CAF ($p < 0,001$) i stężenia PRX ($p = 0,015$) oraz w PLA dla stężenia CAF ($p = 0,006$), lecz nie po dawkach *LOW*, *MEDIUM* ani *HIGH* dla stężenia zarówno CAF, jak i PRX. Umożliwiło to wykorzystanie zmian stężenia obliczonego na podstawie różnicy między pierwszym pomiarem stężenia – przed przyjęciem suplementu (0'), a kolejnymi pomiarami (30', 60', 90').

5.5.1. Analiza regresji wielomianowej (szacowanie stężenia kofeiny i paraksantyny w ślinie na podstawie stężenia w surowicy oraz odwrotnie)

Szczegółowe wyniki regresji wielomianowej w formie graficznej przedstawiono w publikacji 2 (rycina 2).

Modele regresji wielomianowej szacujące stężenie CAF: (1) ze śliny na surowicę oraz (2) z surowicy na ślinę, były istotne statystycznie ($p < 0,05$), co potwierdza ich wiarygodność w przewidywaniu stężenia CAF pomiędzy różnymi materiałami biologicznymi. W przypadku modelu szacującego stężenie CAF w surowicy na podstawie próbek śliny uzyskano współczynnik determinacji $R^2 = 0,79$ ($F(1,517) = 619,58$, $p < 0,001$, $y = 0,1281 + 1,5082x - 0,0375x^2$), co wskazuje na wysoką zgodność danych. Dla modelu odwrotnego, tj. szacowania stężenia CAF w ślinie na podstawie próbek surowicy, wartość współczynnika determinacji wyniosła $R^2 = 0,77$ [$F(1,517) = 506,32$, $p < 0,001$, $y = -0,2465 + 1,0698x - 0,017x^2$], co także potwierdza istotność dopasowania modelu.

Analiza regresji wielomianowej wykazała istotne statystycznie modele pozwalające również na szacowanie stężenia PRX pomiędzy próbkami śliny a surowicy. W przypadku modelu szacowania stężenia PRX w surowicy na podstawie próbek śliny uzyskano równanie: $y = 0,0247 + 1,5501x - 0,1803x^2$, z wartością $F(1,517) = 210,99$, $p < 0,001$ oraz współczynnikiem determinacji $R^2 = 0,61$. Dla modelu odwrotnego, tj. szacowania stężenia PRX w ślinie na podstawie próbek surowicy, równanie przyjęło postać: $y = 0,069 + 0,8603x - 0,0738x^2$, z wartością $F(1,517) = 359,81$, $p < 0,001$ oraz $R^2 = 0,63$.

Wyniki te wskazują na wysoką zgodność między zmiennymi i potwierdzają możliwość precyzyjnego estymowania stężenia CAF i PRX między analizowanymi matrycami biologicznymi.

5.5.2. Zmiany stężenia kofeiny i paraksantyny w surowicy krwi i ślinie

Szczegółowe wyniki stężenia CAF i PRX oraz PRX/CAF RATIO w surowicy krwi i ślinie przedstawiono w publikacji 2 w formie tabelarycznej i graficznej (tabele 2, 3, S1, S2, rys. 3).

Analiza zmian pod wpływem suplementacji CAF wykazała istotne różnice w zakresie głównego efektu dawki zarówno w próbkach surowicy ($p < 0,001$), jak i śliny ($p < 0,001$), a także w zakresie głównego efektu punktu czasowego, ale tylko w próbkach śliny ($p = 0,014$). W próbkach surowicy krwi i śliny wykazano najmniejszą zmianę stężenia CAF po *PLA* i proporcjonalnie do dawki większe zmiany po zażyciu *LOW*, *MEDIUM* i *HIGH*. W próbkach surowicy ujawniono znacząco większe zmiany stężenia CAF w 30' w porównaniu z 90' ($p = 0,040$) oraz w 60' w porównaniu z 90' ($p = 0,035$), jednak stężenia CAF w punktach czasowych 30' i 60' nie różniły się istotnie statystycznie. W próbkach śliny stwierdzono większe zmiany stężenia CAF w 30' w porównaniu z 60' ($p < 0,001$) oraz 90' ($p < 0,001$), jednak stężenia w 60' i 90' nie różniły się istotnie.

W przypadku stężenia PRX ujawniono istotny efekt interakcji czynnika „dawka” i czynnika „punkt czasowy” zarówno w próbkach surowicy ($p < 0,001$), jak i śliny ($p = 0,017$). Wszystkie dawki CAF charakteryzowały się w każdym punkcie czasowym istotnie większymi zmianami stężenia PRX w surowicy krwi niż w *PLA* ($p < 0,001$). Wykazano większą zmianę stężenia PRX w 60' niż w 90' dla dawki *LOW* ($p = 0,015$). Po dawce *MEDIUM* zaobserwowano mniejszą zmianę stężenia PRX w 30' w porównaniu z 60' ($p = 0,018$), jednak większa zmiana miała miejsce w 60' w porównaniu z 90' ($p = 0,037$). Dla dawki *HIGH* większa zmiana stężenia PRX wystąpiła w 60' niż w 30' ($p < 0,001$) i 90' ($p < 0,001$). Z kolei w próbkach śliny stwierdzono istotnie mniejsze zmiany stężenia PRX w 30' w porównaniu z 90' dla dawek *LOW* ($p = 0,016$) i *MEDIUM* ($p < 0,001$) oraz w 30' w porównaniu z 60' ($p = 0,019$) i 90' ($p < 0,001$) dla dawki *HIGH*. Dodatkowo w przypadku dawki *LOW* w punktach czasowych 60' i 90' zmiana stężenia PRX była mniejsza niż w dawkach *MEDIUM* ($p = 0,002$, $p < 0,001$) i *HIGH* ($p < 0,001$, $p < 0,001$). Wszystkie punkty czasowe dla

dawek *MEDIUM* i *HIGH* wykazały większą zmianę stężenia PRX ($p < 0,001$) w porównaniu z wszystkimi punktami czasowymi *PLA*.

Analiza danych wykazała również istotne różnice w zakresie głównego czynnika dawki zarówno w próbkach surowicy ($p = 0,009$), jak i śliny ($p = 0,018$) w odniesieniu do PRX/CAF RATIO. W surowicy ujawniono różnice między *PLA* a dawkami *MEDIUM* ($p = 0,018$) i *HIGH* ($p = 0,002$), przy czym obserwowano zmniejszenie PRX/CAF RATIO po dawkach *MEDIUM* i *HIGH* oraz wzrost po *PLA*. Analiza zmiennych PRX/CAF RATIO w ślinie wykazała różnice między *PLA* a dawkami *LOW* ($p = 0,025$), *MEDIUM* ($p = 0,002$) i *HIGH* ($p < 0,001$), z zauważalnym zmniejszeniem PRX/CAF RATIO we wszystkich dawkach CAF oraz wzrostem po *PLA*.

5.6. Aktywność enzymu CYP1A2 (publikacja 2)

Szczegółowe wyniki aktywności enzymu CYP1A2 w formie tabelarycznej przedstawiono w publikacji 2 (tabele 2 i S1).

Wykazano różnice między *BASE* i *PLA* a wszystkimi dawkami CAF, przy czym po suplementacji CAF zaobserwowano niższe wartości aktywności CYP1A2. Nie stwierdzono jednak istotnych różnic między poszczególnymi dawkami CAF.

5.7. Polimorfizmy pojedynczych nukleotydów *CYP1A2* i *ADORA2A* (publikacje 1 i 2)

Publikacja 1

Szczegółowe wyniki przedstawiono w tabeli 4 publikacji 1. W odniesieniu do polimorfizmu *CYP1A2* w badanej grupie osób trenujących CrossFit/HIFT zidentyfikowano 6 osób „szybko” (homozygoty AA) oraz 20 osób „wolno” (nosiciele allelu C: 3 CC, 17 AC) metabolizujących CAF. W przypadku polimorfizmu *ADORA2A* 4 uczestników wykazywało „wysoką” (homozygoty TT), a 22 „niską” (nosiciele allelu C: 10 CC, 12 CT) wrażliwość na CAF. Nie stwierdzono istotnych interakcji pomiędzy genotypami *CYP1A2* lub *ADORA2A*, dawką CAF a wynikiem FGB_{Total}.

Publikacja 2

Szczegółowe wyniki przedstawiono w tabeli 3 oraz tabelach uzupełniających S1 i S2 publikacji 2. Nie stwierdzono istotnych interakcji genotypów *CYP1A2* ze stężeniem CAF, PRX czy PRX/CAF RATIO w surowicy ani ślinie, ani z aktywnością enzymu CYP1A2.

6. DYSKUSJA

Wybór tematu niniejszej pracy doktorskiej znajduje uzasadnienie zarówno w dynamicznie wzrastającej popularności programu treningowego CrossFit/HIFT, jak i w szerokim stosowaniu CAF jako suplementu o wysokim potencjale ergogenicznym. Trening CrossFit/HIFT, integrując różnorodne elementy wytrzymałościowe, siłowe oraz szybkościowe, stawia osobom trenującym specyficzne wymagania fizjologiczne, które mogą być modulowane przez CAF, wpływając na wskaźniki wysiłkowe, zwłaszcza wydolność fizyczną oraz czas reakcji lub stabilność posturalną. Dotychczasowe badania ograniczają się jednak do oceny ogólnych efektów CAF w kontekście aktywności fizycznej i sportu, podczas gdy wpływ zależny od dawki oraz indywidualna zmienność osób trenujących wynikająca z polimorfizmów genetycznych odpowiedzialnych za metabolizm CAF (np. *CYP1A2*) są nadal niewystarczająco poznane w odniesieniu do treningu typu CrossFit/HIFT. Zaprojektowanie oraz przeprowadzenie badań uwzględnionych w niniejszej pracy doktorskiej było podyktowane przemyślaną naukowo koniecznością optymalizacji suplementacji CAF, z uwzględnieniem specyficznych potrzeb wysiłkowych oraz zróżnicowania genetycznego osób trenujących. Zdaniem autorki dysertacji, aspekt ten ma znaczące praktyczne implikacje dla poprawy zdolności wysiłkowych zarówno w CrossFit/HIFT, jak również pokrewnych dyscyplinach sportu. Wybór tematu pracy doktorskiej był ponadto uzasadniony wcześniejszymi doświadczeniami autorki, która uczestniczyła w badaniu wpływu trzech różnych dawek CAF na wskaźniki wysiłkowe zawodników trenujących judo (Durkalec-Michalski i in. 2019). Zdobyte wówczas doświadczenie badawcze, zwłaszcza w zakresie ergogenicznych efektów CAF, dostarczyło solidnych podstaw teoretycznych i metodologicznych do zaprojektowania badań nad bardziej złożonymi i interdyscyplinarnymi wymaganiami treningu CrossFit/HIFT. Dodatkowo osobiste zaangażowanie autorki niniejszej dysertacji w trening CrossFit pozwala jej lepiej rozumieć specyficzne potrzeby tej formy aktywności fizycznej, co umożliwia projektowanie badań o dużym znaczeniu praktycznym i potencjalnie wysokiej wartości aplikacyjnej dla środowiska sportowego.

Mając na względzie opisane powyżej aspekty, głównym celem przedstawionego projektu doktorskiego uczyniono ocenę wpływu trzech różnych dawek CAF oraz PLA na specyficzne zdolności wysiłkowe, częstość skurczów serca, subiektywne odczucie zmęczenia, stabilność posturalną, czas reakcji, stężenie mleczanu i pirogronianu oraz zmiany stężenia CAF, PRX, PRX/CAF RATIO w surowicy krwi i ślinie w grupie średnio wytrenowanych osób uczestniczących w treningu CrossFit/HIFT.

Publikacja 1

Celem badań, których wyniki zostały przedstawione w publikacji 1, była ocena wpływu trzech różnych dawek CAF w postaci doraźnej podaży 3, 6 i 9 mg_{CAF}/kg_{BM} u osób trenujących CrossFit/HIFT na specyficzne zdolności wysiłkowe, czas reakcji oraz stabilność posturalną. Ponadto monitorowano szereg innych, ważnych w aspekcie obciążenia organizmu wskaźników, takich jak częstość skurczów serca, subiektywne odczucie zmęczenia, stężenie mleczanu i pirogronianu, oraz identyfikowano polimorfizmy pojedynczych nukleotydów *CYP1A2* i *ADORA2A*. Postawiono hipotezy, że ergogeniczny wpływ CAF jest zróżnicowany i zależny od dawki w odniesieniu do wszystkich mierzonych wskaźników (wyższa dawka będzie związana z większym wpływem na zdolności wysiłkowe w FGB, HR, RPE,

R_{Time} , P_{Stab} , stężenia La i Pa). Ponadto postanowiono zweryfikować, czy wpływ podaży CAF na zdolności wysiłkowe jest zależny od genotypów *CYP1A2* (homozygoty AA reagują bardziej niż heterozygoty AC oraz homozygoty CC) i *ADORA2A* (homozygoty TT reagują bardziej niż nosiciele allelu C). Hipotezy te nie zostały jednak potwierdzone, ponieważ nie zaobserwowano istotnych różnic w specyficznych dla CrossFit zdolnościach wysiłkowych, czasie reakcji ani stabilności posturalnej między różnymi dawkami CAF ani w zależności od genotypów. Niemniej ze sportowego punktu widzenia dawka *MEDIUM* ($6 \text{ mg}_{CAF}/\text{kg}_{BM}$) odznaczała się najwyższą skutecznością poprawy całkowitej liczby powtórzeń w całym teście FGB oraz w rundach 1 i 2, jak również w zakresie R_{Time} przed FGB i M_{Time} ogółem. Zaobserwowano także istotny statystycznie efekt praktyki między następującymi po sobie wizytami badawczymi. Według dostępnych danych literaturowych są to pierwsze badania określające wpływ trzech różnych dawek CAF na wyniki specyficznego, zwalidowanego testu FGB, czas reakcji i stabilność posturalną u osób trenujących CrossFit/HIFT.

Aktualnie dostępne są jedynie wyniki czterech badań (Caetano i in. 2023; Fogaça i in. 2020; Stein i in. 2020; Ziyaiyan i in. 2023), w których oceniano wpływ suplementacji CAF u osób trenujących CrossFit/HIFT. W żadnym z nich nie zastosowano jednak zróżnicowanych dawek CAF ani też nie korzystano ze zwalidowanego testu FGB specyficznego dla tej dyscypliny. Jak wspomniano powyżej, wyniki przedstawione w publikacji 1 wykazały, że z punktu widzenia praktyki sportowej najskuteczniejszą dawką CAF była *MEDIUM*, nie zaobserwowano jednak istotnych różnic między różnymi dawkami tej substancji. Interesujące jest, że nie wykazano korzystnego efektu większej dawki (*HIGH*) w porównaniu z dawką powszechnie zalecaną: *LOW* ($3 \text{ mg}_{CAF}/\text{kg}_{BM}$) – *MEDIUM* ($6 \text{ mg}_{CAF}/\text{kg}_{BM}$). Warto jednak zauważyć, że cały test FGB trwał 17 minut (15 minut aktywnej pracy z dwiema 1-minutowymi przerwami pomiędzy poszczególnymi rundami), a dawka *MEDIUM* była najskuteczniejsza podczas pierwszych dwóch rund. Wskazuje to, że najwyższa zazwyczaj zalecana dawka CAF w sporcie ($6 \text{ mg}_{CAF}/\text{kg}_{BM}$) może być szczególnie skuteczna na wczesnych etapach dłuższego treningu CrossFit lub bardziej efektywna w krótszych, ale wysoko intensywnych zadaniach wysiłkowych.

Warto wspomnieć, że również Fogaça i in. (2020) nie zaobserwowali istotnych różnic między wpływem $6 \text{ mg}_{CAF}/\text{kg}_{BM}$ w porównaniu z *PLA* na zdolności wysiłkowe w CrossFit w teście opartym na 10 minutach maksymalnej liczby powtórzeń/rund (*AMRAP*, ang. *as many reps/rounds as possible*) obejmującym *Double-unders* (podwójne skoki na skakance) i *Power Snatches* (rwanie sztangi nad głowę). Nie zaobserwowano także oddziaływania CAF na siłę mięśniową (*Handgrip*, siła chwytu) i moc (*Bench Throw*, eksplozywne wyciśnięcie sztangi z wyrzutem na ławce podczas leżenia; *Jump Squat*, przysiad z wyskokiem, i *Countermovement Jump*, wyskok dosiężny z zamachem) u osób trenujących CrossFit. Także doraźna suplementacja $5 \text{ mg}_{CAF}/\text{kg}_{BM}$ w porównaniu z *PLA* przed testem *Cindy* nie poprawiała rejestrowanych wyników (Stein i in. 2020). W innym badaniu Ziyaiyan i in. (2023) oceniali zdolności wysiłkowe w CrossFit również za pomocą testu *Cindy*, w tym przypadku po zażyciu $6 \text{ mg}_{CAF}/\text{kg}_{BM}$ w porównaniu z przyjęciem wodorowęglanu sodu (NaHCO_3) oddzielnie i w połączeniu. Wyniki uzyskane przez tych autorów wykazały, że wszystkie interwencje poprawiły zdolności wysiłkowe w porównaniu z *PLA*, jednak nie ujawniono istotnego efektu suplementacji ani statystycznie istotnych różnic między suplementowanymi grupami. Podkreślić należy jednak, że ten test typowy dla treningu CrossFit jest szczególnie obciążający i stanowi wyjątkowe wyzwanie dla sportowców, gdyż trwa 20 minut i wymaga od uczestników wykonania jak największej liczby powtórzeń trzech powtarzanych kolejno po sobie ćwiczeń (5 podciągnięć na drążku, 10 pompek, 15 przysiadów bez obciążenia). W badaniach o zbliżonej tematyce, prowadzonych przez Caetana i in. (2023), uwzględniono ocenę wpływu $6 \text{ mg}_{CAF}/\text{kg}_{BM}$ na

wynik testu maksymalnego pojedynczego powtórzenia (1 RM) w przysiadzie ze sztangą oraz lokalną wytrzymałość mięśniową (liczba powtórzeń z obciążeniem dobranym procentowo do 1 RM). Autorzy stwierdzili, że wynik wytrzymałości mięśniowej oraz średnia liczba powtórzeń były korzystnie wyższe dla grupy CAF w porównaniu z PLA.

Omawiając tematykę wpływu CAF na wydolność fizyczną, warto zwrócić uwagę, że uzyskiwane wyniki badań nie zawsze są w pełni jednorodne. Należy podkreślić, że pomimo pozornej wielości metaanaliz dotyczących wpływu CAF na podobne wskaźniki „wydolnościowe”, często wykazują one sprzeczne rezultaty. Wyniki opublikowanego w ostatnim czasie przeglądu parasolowego (Grgic i in. 2020) na temat ergogenicznego wpływu CAF na wydolność fizyczną umożliwiły zminimalizowanie potencjalnych ograniczeń metodologicznych wcześniejszych metaanaliz. Wielkość efektu pozytywnego wpływu CAF w opublikowanych metaanalizach mieściła się w zakresie od bardzo małej do umiarkowanej (d Cohena) (Barreto i in. 2024; Grgic i in. 2020). W zakresie wytrzymałości tlenowej większość badań wykazała małe do umiarkowanych ergogeniczne efekty CAF (zakres ES: 0,22–0,61). Analizy dotyczące wpływu CAF na różne miary siły mięśniowej wskazały z kolei na bardzo małe do małych efekty ergogeniczne (zakres ES: 0,16–0,20). Jako niskie (zakres ES: 0,28–0,38) określono również efekty CAF na wytrzymałość mięśniową. Inne wyniki ergogenicznych efektów CAF, odnoszące się do średniej i maksymalnej mocy, określono jako bardzo małe do małych (zakres ES: 0,18–0,27), na wysokość skoku pionowego jako bardzo małe (ES: 0,17), na szybkość biegu, jazdy na rowerze lub wiosłowania jako małe (ES: 0,41), a na różne formy „krótkotrwałego wysiłku o wysokiej intensywności” (czas do wyczerpania, średnia i szczytowa moc, próba czasowa) jako bardzo małe (ES: 0,16) (Grgic i in. 2020). Podsumowując, przyjmuje się, że CAF ma działanie ergogeniczne w zakresie oddziaływania na szereg różnych komponentów wydolności fizycznej i zdolności wysiłkowych, zwłaszcza wytrzymałości tlenowej i mięśniowej, siły mięśniowej, mocy, wyskoku i zdolności szybkościowych. Niektórzy autorzy (Grgic i in. 2020; Saunders i in. 2023) zakładają ponadto, że CAF działa wspomagająco nie tylko na wydolność tlenową, ale również na potencjał anaerobowy organizmu.

Wyniki przeprowadzonych badań własnych (publikacja 1) wskazują na brak różnic w zakresie subiektywnego odczucia zmęczenia między dawkami CAF a PLA. Choć dawka CAF nie miała istotnego wpływu na RPE, lepsze wyniki (niższe RPE) po dawce *MEDIUM* CAF mogą sugerować jej korzystny wpływ na centralny układ nerwowy, co pozwala na prowadzenie wysiłku z większą intensywnością przy tym samym poziomie RPE. Spekuluje się ponadto, że wysiłki wielostawowe mogą zwiększać RPE (Grgic 2021). W jedynej obecnie metaanalizie dotyczącej CAF i RPE (Doherty i Smith 2005) wskazano, że spożycie CAF zmniejsza RPE podczas wysiłku, ale nie wpływa na RPE uzyskiwane na końcu wyczerpującego wysiłku. Autorzy interpretowali to jako następstwo efektu zmniejszenia percepcji wysiłku podczas intensywnej pracy mięśniowej. Wyniki publikacji 1 opierały się na standardowej skali Borga z wartościami od 6 do 20. Niestety, trzy inne badania dotyczące CAF w treningu CrossFit używały innej, 10-punktowej skali. Stein i in. (2020) zastosowali 10-punktową skalę Likerta, która mogła być niewystarczająco czuła, aby uchwycić faktyczne zmiany podczas protokołu. W przytoczonym badaniu nie zaobserwowano istotnych różnic w RPE między podażą CAF a PLA. Podobnie Fogaça i in. (2020) stwierdzili brak różnicy w RPE po treningu między CAF a PLA, korzystając z 10-punktowej skali Borga. Z kolei Ziyaiyan i in. (2023) rejestrowali RPE na skali od 1 do 10, dowodząc, że kombinacja CAF i NaHCO_3 znacząco zmniejszyła RPE w porównaniu z warunkami kontrolnymi i PLA. Również inne badania, poza obszarem CrossFit/HIFT, nie wykazały wpływu CAF na RPE (Duncan i Oxford 2011). Stwierdza się zatem, że efekty podaży CAF na RPE generują zróżnicowane wyniki (Grgic 2021), zwłaszcza przy zastosowaniu różnych protokołów

wysiłkowych. Co więcej, Crawford i in. (2018) w badaniu dotyczącym zastosowania RPE w HIFT zasugerowali, że 15-punktowa skala może być bardziej odpowiednia dla zawodników tej dyscypliny. Z tego względu, biorąc pod uwagę, że RPE jest zazwyczaj oceniane po zakończeniu testu wysiłkowego, przyszłe badania mogłyby uwzględniać dodatkowe pomiary RPE w trakcie treningu.

Spożycie CAF może wpływać na częstość skurczów serca zarówno w spoczynku, jak i podczas wysiłków, głównie poprzez aktywację centralnego układu nerwowego na drodze uwalniania katecholamin, stymulacji kory nadnerczy dzięki wydzielaniu kortykoidów oraz działaniu na układ moczowy. Procesy te prowadzą do zmian w autonomicznej modulacji pracy serca, co w efekcie może powodować tachykardię (Bunsawat i in. 2015). W metaanalizie Benjamima i in. (2020) wykazano, że po spożyciu CAF HR wzrasta zarówno podczas wysiłków fizycznych, jak i w fazie regeneracji. Ponadto wskazano, że CAF może wpływać na HR przed wysiłkiem fizycznym, w trakcie oraz po jego zakończeniu. W publikacji 1 rejestrowano maksymalną i średnią częstość skurczów serca (HR_{max} i HR_{mean}) podczas FGB, jednak nie zaobserwowano różnic między dawkami CAF a PLA. Wyniki te trudno porównać z innymi danymi, bowiem dostępne jest tylko jedno badanie dotyczące CAF w kontekście treningu CrossFit, gdzie analizowano zmiany HR podczas protokołu testu wysiłkowego (Ziyaiyan i in. 2023). Autorzy tej publikacji stwierdzili, że HR_{max} na końcu treningu była istotnie wyższa w grupach przyjmujących CAF i CAF w połączeniu z $NaHCO_3$ w porównaniu z grupą kontrolną. W literaturze naukowej wpływ CAF na HR podczas wysiłku fizycznego jest niejednoznaczny. We wcześniejszym badaniu z udziałem autorki niniejszej dysertacji (Durkalec-Michalski i in. 2019) wykazano, że HR bezpośrednio po i 1 minutę po teście wysiłkowym była istotnie wyższa po spożyciu dawek *MEDIUM* i *HIGH*. Ponadto spożycie dawki *MEDIUM* znacząco podniosło HR w porównaniu z dawką *LOW* oraz *PLA*, natomiast po spożyciu dawki *HIGH* wartości HR były istotnie wyższe również w porównaniu z *BASE*. Z kolei Smirmaul i in. (2017) odnotowali wzrost HR podczas jazdy na rowerze po spożyciu CAF, sugerując, że różnice w HR_{max} były zależne bardziej od CAF niż od rodzaju wysiłku. Również Bunsawat i in. (2015) oraz Lopes-Silva i in. (2015) wykazali wyższą HR w grupie stosującej CAF (odpowiednio HR_{max} i HR_{mean}). Z kolei Glaister i in. (2016) stwierdzili, że w początkowych fazach submaksymalnego testu wysiłkowego z narastającym obciążeniem na cykloergometrze z hamulcem elektromagnetycznym podaż CAF związana była z niższą HR. Niemniej inne badania (Gonzaga i in. 2017; Kliszczewicz i in. 2018), podobnie jak wyniki publikacji 1, nie wykazały różnic HR między CAF a PLA.

Najnowsza metaanaliza (Lorenzo Calvo i in. 2021) dotycząca wpływu CAF na funkcje poznawcze w sporcie wskazała, że po spożyciu CAF obserwuje się poprawę wyników w różnych obszarach poznawczych. Porównywane tam badania raportowały pozytywny wpływ CAF na bardziej złożone procesy poznawcze (selektywną uwagę wzrokową mierzoną testem Stroopa i testem Flankera), z wyraźniejszym efektem w zadaniach o niższych wymaganiach uwagi (Lorenzo Calvo i in. 2021). Badania obejmowały takie aspekty, jak prosta prędkość psychomotoryczna (prosty czas reakcji – R_{Time}), złożona szybkość podejmowania decyzji i długość czasu podejmowania decyzji (czas reakcji przy wyborze – *choice* R_{Time}) oraz prędkość przygotowania do złożonej reakcji (S–R – niekompatybilny czas reakcji – CR_{Time}), mierzone przez test prostego czasu reakcji wzrokowej, test motoryczny CR_{Time} oraz test CR_{Time} . Wyniki wspomnianej metaanalizy wykazały, że CAF może poprawić prosty R_{Time} i *choice* R_{Time} , jednak efekt ten wydaje się zależny od protokołu wysiłkowego. Wykazano, że pojedyncza, doraźna dawka CAF nie wiąże się z ryzykiem zaburzenia funkcji poznawczych związanych z wydolnością fizyczną (Lorenzo Calvo i in. 2021). Sugerowano również, że wpływ CAF na R_{Time} może wynikać raczej z oddziaływania na procesy percepcyjno-uważkowe aniżeli motoryczne (Saville i in. 2018). W wynikach przedstawionych w publikacji 1

nie zaobserwowano istotnych różnic w R_{Time} i M_{Time} między różnymi dawkami CAF i PLA, chociaż dawka *MEDIUM* wykazała skrócenie R_{Time} i M_{Time} przed FGB. Co ciekawe, przy tej dawce zmienność R_{Time} utrzymywała się pomimo wysiłku, podczas gdy po podaży innych dawek oraz PLA lub BASE obserwowano znaczący spadek zmienności M_{Time} bezpośrednio po FGB. W badaniu Share i in. (2009) – podobnie – nie stwierdzono wpływu spożycia CAF (2 i 4 mg_{CAF}/kg_{BM}) na wyniki w strzelaniu do rzutków, zwłaszcza na R_{Time} i czas śledzenia celu. Church i in. (2015) również nie zaobserwowali różnic w umiejętności śledzenia wielu obiektów po spożyciu 3 mg_{CAF}/kg_{BM} na 60 minut przed wysiłkiem. Chociaż CAF może poprawić ogólną szybkość przetwarzania informacji w zadaniach wymagających bardziej złożonych funkcji, nie przypisuje się tego specyficznemu wpływowi na selektywną uwagę wzrokową. Co więcej, choć CAF może skrócić czas reakcji i zmniejszyć liczbę błędów w prostym R_{Time} i CR_{Time} , niedawno opublikowana metaanaliza wykazała, że nie zawsze przekłada się to na wyniki związane z wysiłkiem fizycznym (Lorenzo Calvo i in. 2021). Crowe i in. (2006) wykazali, że CAF nie skróciła R_{Time} w teście prostego czasu reakcji wzrokowej, choć efekt ten mógł być osłabiony ze względu na stosunkowo późny moment przyjęcia CAF (90 minut przed testem). Russell i in. (2020), badając wpływ stosowania gumy do żucia z CAF u rugbyistów, nie zaobserwowali interakcji efektu czasu i suplementacji CAF w prostym R_{Time} . Church i in. (2015) oraz Share i in. (2009) także nie stwierdzili różnic między CAF a PLA w niestandardowym pomiarze R_{Time} dla górnych i dolnych partii ciała. Ali i in. (2016) również nie zaobserwowali wpływu 6 mg_{CAF}/kg_{BM} na zdolność podejmowania złożonych decyzji, mierzoną testem CR_{Time} . Z kolei Bello i in. (2019) wykazali, że dawki 3, 6 i 9 mg_{CAF}/kg_{BM} u piłkarzy nożnych poprawiły prostą prędkość psychomotoryczną, CR_{Time} oraz czas reakcji poznawczej pod wpływem obciążenia. Hogervorst i in. (1999) stwierdzili, że złożona prędkość psychomotoryczna i R_{Time} na niekompatybilne bodźce, mierzone testem motorycznym CR_{Time} , były znacząco szybsze przy niskiej dawce CAF niż w grupie PLA. Co więcej, analiza genotypów *CYP1A2* nie wykazała różnic między homozygotami AA a nosicielami allelu C pod względem R_{Time} po spożyciu CAF (Salinero i in. 2017).

Wyniki zamieszczone w publikacji 1 nie wykazały zarówno wpływu CAF, jak i różnic między jej dawkami na wskaźniki stabilności posturalnej wyrażone jako Area95 i V_{COP} . Mimo że nie zaobserwowano istotnych różnic między dawkami CAF a PLA, warto zauważyć (interpretując jedynie wyniki po FGB), że PLA było wyraźnie korzystniejsze niż jakakolwiek dawka CAF zarówno pod względem V_{COP} , jak i Area95. Może to potwierdzać wpływ CAF na ośrodkowy układ nerwowy. Niestety, brakuje innych badań na temat wpływu CAF na równowagę w kontekście testów wysiłkowych. Wyniki przeglądu systematycznego autorstwa Briggs i in. (2021) dotyczącego wpływu CAF na równowagę w pozycji stojącej wskazują, że u młodszych (<65 r.ż.) uczestników równowaga nie ulega zmianie po spożyciu CAF. U starszych badanych (>65 r.ż.) obserwuje się natomiast istotne pogorszenie równowagi, co sugeruje zasadność uwzględnienia wieku jako czynnika wpływającego na efekt CAF w pozycji stojącej. Ponadto CAF należy uznać za potencjalny czynnik zakłócający ocenę równowagi. W badaniach przeprowadzonych wyłącznie u młodszych dorosłych (<65 r.ż.) wykazano, że dawki 100–500 mg CAF, przyjęte na 30–80 minut przed testem nie wpływały na równowagę w pozycji stojącej mierzonej na stabilnym podłożu zarówno u osób z otwartymi, jak i zamkniętymi oczami (Ben Waer i in. 2021; Liguori i Robinson 2001; Nuotto i in. 1982; Swift i Tiplady 1988). Nie wykazano także wpływu CAF na wyniki testów z ruchomą otoczką wizualną lub w warunkach zmniejszających proprioceptywną informację o kołysaniu ciała (Liguori i Robinson 2001). Ben Waer i in. (2021) nie stwierdzili istotnego wpływu 100 lub 400 mg CAF na równowagę w pozycji stojącej na powierzchni piankowej z otwartymi oczami, ale zaobserwowali 16-procentową redukcję kołysania ciała, mierzonego jako wychylenie środka siły nacisku, po spożyciu 100 mg CAF.

W obszarze oceny stężenia wybranych markerów biochemicznych we krwi wyniki publikacji 1 wykazały, że najwyższe stężenie *La* po FGB zaobserwowano przy najwyższej dawce CAF (*HIGH*). Podwyższenie stężenia *La* we krwi może towarzyszyć suplementacji CAF, choć nie zawsze jest to obserwowane (Glaister i in. 2016). Warto wspomnieć, że w spoczynku CAF nie zmienia stężenia *La*, co oznacza, że jego wzrost może być wyłącznie efektem intensywniej pracy mięśni, ze znaczną przewagą przemian beztlenowych (Glaister i in. 2016). Mimo że w niektórych badaniach o podobnym profilu zaobserwowano istotny wzrost *La* (Black i in. 2015; Graham i in. 2000), inne prace nie wykazały wpływu CAF na *La* podczas wysiłków submaksymalnych (Simmonds i in. 2010; Stadheim i in. 2013). Nawet jeśli wzrost *La* można tłumaczyć równoczesnym wzrostem intensywności wysiłku wywołanym przez działanie CAF (Black i in. 2015; Stadheim i in. 2013), mechanizm tego zjawiska nie jest całkowicie poznany (Glaister i in. 2016). Można przyjąć, że CAF powoduje wzrost *La* poprzez mechanizmy pośrednie, takie jak zwiększenie wydzielania adrenaliny lub stymulację ośrodkowego układu nerwowego, łagodząc ból i umożliwiając wydłużenie czasu trwania wysiłku, co prowadzi do akumulacji *La* (Davis i Green 2009). Graham i in. (2000) nie zakładali jednak istnienia takiego mechanizmu produkcji lub uwalniania *La* przez aktywne mięśnie podczas wysiłków submaksymalnych. Możliwe, że było to w tym przypadku spowodowane wpływem CAF na zmniejszenie transferu *La* z mięśni do krwioobiegu, niewystarczającą czułością pomiaru i analiz na wykrycie zmian w produkcji i uwalnianiu *La* przez mięśnie lub faktem, że *La* może być produkowany także przez nieaktywne mięśnie. Najbardziej prawdopodobna wydaje się pierwsza możliwość, ponieważ – choć trudno zidentyfikować dokładny mechanizm – wykazano, że sygnalizacja adenozynowa stymuluje glukoneogenezę, która odpowiada za 20–30% usuwania *La* z komórek mięśniowych podczas wysiłku (Glaister i in. 2016). Glaister i in. (2016), w przeciwieństwie do Grahama i in. (2000), nie stwierdzili wpływu CAF na szybkość usuwania *La* podczas okresu regeneracji, sugerując, że wzrost stężenia *La* we krwi był spowodowany zwiększonym napływem *La* z pracujących mięśni, co wspiera hipotezę o pobudzeniu przez kofeinę tempa glikolizy. Ponadto wiadomo, że konwersja *La* do *Pa* zachodzi głównie w pracujących mięśniach i że – w ujęciu netto – *La* i *Pa* są uwalniane w podobnym tempie. Tętniczy *La* jest głównym źródłem *Pa* uwalnianego z mięśni, ale większość żylnego *Pa* jest usuwana przed wejściem do krążenia tętniczego (Henderson i in. 2004). Badania potwierdzają jednak wzrost *Pa* podczas wysiłku (Durkalec-Michalski i in. 2018; Podgórski i in. 2015). Wyniki publikacji 1, podobnie jak w literaturze, wykazały wzrost *Pa* podczas protokołu badań, jednak różne dawki CAF nie miały wpływu na jego końcowe stężenie we krwi.

Znaczenie polimorfizmów pojedynczych nukleotydów w genach *CYP1A2* i *ADORA2A* w kontekście wydolności fizycznej wciąż pozostaje niejasne. Z tego względu nadal analizuje się genotypowe ograniczenia, które mogą wpływać na zdolność CAF do wykazywania jej ergogenicznych efektów (Fulton i in. 2018). Ponadto spekuluje się, że potencjalnie pozytywny wpływ SNP jest większy u mężczyzn niż u kobiet, a ergogeniczny charakter CAF może różnić się międzypersonalnie (Nehlig 2018). Warto również zauważyć, że ze względu na różnice w proporcjach poszczególnych genotypów w populacji światowej trudno jest uchwycić ich rzeczywisty wpływ. Zgodnie z zasadą Hardy’ego–Weinberga, częstość występowania genotypów w genie *CYP1A2* w populacji wynosi około 45% dla AA, 45% dla AC i 10% dla CC (Saunders i in. 2023).

Dane z metaanalizy Barreta i in. (2024) sugerują, że w odniesieniu do polimorfizmu rs762551 genu *CYP1A2* – homozygoty AA mogą najkorzystniej reagować na suplementację CAF, podczas gdy u homozygot CC CAF może działać ergolitycznie. Rzeczywiście, badania Guest i in. (2018), Womacka i in. (2012) oraz Wong i in. (2021) wspierają tezę,

że suplementacja CAF przynosi większe korzyści ergogeniczne u osób o szybkim metabolizmie w porównaniu z nosicielami allelu C. Co ciekawe jednak, większość badań tego nie potwierdza (Carswell i in. 2020; Giersch i in. 2018; Glaister i in. 2021; Grgic i in. 2021; Zawieja i in. 2023). Z kolei w przypadku polimorfizmu rs5751876 genu *ADORA2A* tylko jedno badanie pilotażowe (Loy i in. 2015) wykazało, że genotypy mogą modulować zdolności wysiłkowe, a nosiciele allelu C mogą być określani jako osoby „nieodpowiadające” na suplementację, podczas gdy u homozygot TT intensywny wysiłek poprawia wyniki. Inne badania (Carswell i in. 2020; Glaister i in. 2021; Muñoz i in. 2020) nie powtórzyły jednak wspomnianych wyników i nie dowiodły wpływu genotypów *ADORA2A* na modulację korzyści płynących z suplementacji CAF (Saunders i in. 2023). Wyniki publikacji 1 również nie wykazały wpływu polimorfizmów *CYP1A2* ani *ADORA2A* na zdolności wysiłkowe, nawet przy zastosowaniu różnych dawek CAF.

Publikacja 2

Celem badań, których wyniki zostały przedstawione w publikacji 2, była ocena wpływu trzech różnych dawek CAF w postaci doraźnej podaży 3, 6 i 9 mg_{CAF}/kg_{BM} u osób trenujących CrossFit/HIFT na zmiany stężenia CAF i PRX oraz stosunek PRX/CAF w różnych punktach czasowych (przed suplementacją i po suplementacji). Badania te przeprowadzono zarówno na próbkach surowicy krwi, jak i śliny u osób trenujących CrossFit/HIFT, uwzględniając dodatkowo aktywność enzymu CYP1A2 oraz genotypy *CYP1A2*. Zgodnie z wiedzą autorki niniejszej dysertacji, publikacja 2 jest pierwszą pracą oceniającą wpływ CAF i różnice efektów wywołanych przez trzy różne dawki CAF oraz PLA na wspomniane wskaźniki. Postawiono hipotezy, że wyższe dawki CAF wywołują większe zmiany stężenia CAF i PRX w surowicy krwi i ślinie, a największa zmiana związana ze wzrostem stężenia CAF od poziomu sprzed suplementacji jest osiągana 60 minut po spożyciu CAF. Ponadto założono, że wyższa dawka CAF prowadzi do zwiększenia aktywności enzymu CYP1A2, a nosiciele allelu C (w przypadku genotypów *CYP1A2*) odznaczają się większą aktywnością enzymu CYP1A2 w porównaniu z homozygotami AA. Wyniki przeprowadzonych badań wskazały, że – zgodnie z postawioną hipotezą – wyższe dawki CAF indukowały większe zmiany stężenia CAF i PRX zarówno w surowicy krwi, jak i ślinie. Równocześnie nie potwierdzono hipotezy, że największa zmiana stężenia CAF w stosunku do wartości wyjściowej wystąpi po 60 minutach od suplementacji, ponieważ zarejestrowano ją już po 30 minutach od spożycia. Ponadto nie wykazano, aby aktywność enzymu CYP1A2 zależała od zastosowanej dawki (wyższa dawka nie zwiększyła aktywności enzymu). Natomiast genotypy *CYP1A2* nie wykazały interakcji z indukowalnością tego enzymu.

Jak nadmieniono w publikacji 2, stężenia CAF i PRX były mierzone w dwóch ludzkich materiałach biologicznych. Wykazano korelacje umiarkowane do silnych pomiędzy stężeniami CAF i PRX w surowicy krwi i ślinie, co wskazuje na możliwość zastosowania mniej inwazyjnych technik pozyskiwania materiału biologicznego w warunkach wysiłkowych. W przypadku CAF zmienne zależne (stężenie w ślinie w odniesieniu do surowicy) zostały wyjaśnione w 79% dla CAF oraz w 61% dla PRX. Silna korelacja między stężeniem CAF w surowicy i ślinie opisana w literaturze sugeruje, że ślina może być skutecznie wykorzystywana do rzetelnego określenia stężenia CAF w surowicy krwi (Scott i in. 1984). W pracy Grzegorzewskiego i in. (2022) przeprowadzono analizę regresji liniowej, aby określić związki między pomiarami CAF i PRX w ślinie i krwi. Czynniki skali i współczynniki korelacji Pearsona między stężeniem w ślinie i krwi dla CAF i PRX wynosiły odpowiednio 0,79 i 0,68 oraz 0,84 i 0,76.

Obecne wytyczne zalecają spożycie CAF w dawkach 3–6 mg_{CAF}/kg_{BM} na 30–60 minut przed rozpoczęciem wysiłku fizycznego (Guest i in. 2021), jednak ze względu na jej dzia-

łanie na ośrodkowy układ nerwowy przyjmuje się, że CAF odznacza się największym działaniem ergogenicznym pod koniec wysiłku – czyli właśnie wtedy, gdy wzrasta poziom subiektywnego odczucia zmęczenia (Davenport i in. 2020; Southward i in. 2018). Niemniej badania wykazały, że po osiągnięciu szczytowego stężenia CAF we krwi może ono utrzymywać się na stabilnym, podwyższonym poziomie nawet przez kilka godzin po spożyciu (Graham i Spriet 1995).

Warto zauważyć, że w piśmiennictwie – inaczej niż w omawianym projekcie doktorskim – stężenie CAF lub jej metabolitów oznaczano wyłącznie w surowicy lub osoczu (zwykle była to dodatkowa analiza), a krew pobierano tylko przed suplementacją i w jednym punkcie czasowym. Ponadto wyniki większości badań wysiłkowych wskazywały na bliskie zeru stężenie CAF przed suplementacją poprzedzoną 24-godziną abstynencją, przy czym rzeczywiste wartości mogły w praktyce przekraczać „zero” (Lajin i in. 2021) i wynosić od 0,1 do nawet 5,0 $\mu\text{g/mL}$ (Jacobson i in. 1994). Pomimo 24-godzinnej abstynencji od CAF zastosowanej u uczestników niniejszego projektu doktorskiego zaobserwowano podobne (wyższe) stężenia badanych substancji i w związku z tym wprowadzono standaryzację wartości oraz ocenę zmian stężeń CAF i PRX względem standaryzowanego poziomu „zerowego” sprzed suplementacji.

W literaturze wykazano również, że efekty ergogeniczne są mało prawdopodobne przy dawkach CAF niższych niż *LOW*, przy czym poziom tej substancji oznaczane w osoczu są określone w zakresie 2,91–3,88 $\mu\text{g/mL}$ (Spriet 2014). Na podstawie wcześniejszego badania (Graham i Spriet 1995), w którym analizowano stężenie CAF w osoczu po trzech dawkach CAF, stwierdzono, że dawka *MEDIUM* może zwiększyć stężenie CAF w osoczu do 7,76 $\mu\text{g/mL}$, a *HIGH* nawet do 11,64–13,58 $\mu\text{g/mL}$ po 60 minutach od spożycia. Dodatkowo wykazano, że poziom PRX nie różnił się między dawkami, co sugeruje, że metabolizm wątrobowy CAF może osiągać już wcześniej swoisty stan nasycenia.

Dotychczasowe badania, w tym badania wysiłkowe, wykazały podobne wartości dla średniego szczytowego stężenia CAF w surowicy/osoczu krwi po przyjęciu CAF, mieszczące się w zakresie 3,90–8,19 $\mu\text{g/mL}$ dla CAF (Benowitz i in. 1995; Blanchard i Sawers 1983; Collomp i in. 1991; Sampaio-Jorge i in. 2021; Simmonds i in. 2010; Skinner i in. 2013b; Stadheim i in. 2013) oraz 1,08–1,60 $\mu\text{g/mL}$ dla PRX (Benowitz i in. 1995; Hetzler i in. 1990; Simmonds i in. 2010). Badania wskazują jednak na duże indywidualne różnice w czasie osiągania szczytowego stężenia CAF (Desbrow i in. 2009; Robertson i in. 1978). Sugeruje się także, że osiągnięcie maksymalnego stężenia CAF w surowicy/osoczu przed wysiłkiem wytrzymałościowym może nie być najważniejszym czynnikiem w maksymalizacji ergogenicznego potencjału CAF. Prawdopodobnie kluczowe znaczenie ma w tym względzie stężenie CAF w miejscu działania (w ośrodkowym układzie nerwowym lub komórkach mięśniowych), co jest obecnie niemożliwe do weryfikacji. Innymi rozpatrywanymi czynnikami są: wpływ metabolitów CAF lub osiągnięcie szczytowego stężenia z opóźnieniem podczas wysiłku wytrzymałościowego, gdy zmęczenie i odczuwanie wysiłku są bardziej nasilone (Skinner i in. 2013b).

Na podstawie wyników przedstawionych w publikacji 2 wykazano, że stężenie CAF było wyraźnie zależne od przyjętej dawki CAF (najwyższe przy najwyższej dawce). Co ciekawe, szczytowa zmiana wystąpiła po każdej dawce od momentu 0' do 30', a następnie poziom CAF utrzymywał się do 90', co sugeruje stabilność stężenia CAF w surowicy krwi i może to stanowić wartościową obserwację w kontekście naukowym i praktycznym. Simmonds i in. (2010) wykazali, że dawka 5 $\text{mg}_{\text{CAF}}/\text{kg}_{\text{BM}}$ (w porównaniu z *PLA*) znacząco zwiększyła stężenie CAF w osoczu po 60 minutach od przyjęcia i poprawiła wydolność supramaksymalną u wysoko wytrenowanych kolarzy. W badaniu Sampaia-Jorgego i in. (2021) z udziałem rekreacyjnie trenujących kolarzy, którzy przyjęli kapsułki zawierające

6 mg_{CAF}/kg_{BM} lub *PLA*, zaobserwowano znaczące efekty dotyczące czasu i rodzaju interwencji na stężenie CAF w surowicy krwi, choć próbki krwi pobrano tylko przed suplementacją i 60 minut po przyjęciu CAF. Z kolei w badaniu Stadheima i in. (2013) dziesięciu zdrowych wysoko wytrenowanych narciarzy biegowych przyjęło 6 mg_{CAF}/kg_{BM} lub *PLA* na 75 minut przed testem wydolnościowym (C-PT). Próbki krwi do analizy stężenia CAF pobierano częściej – w spoczynku, 35 minut po przyjęciu, po ostatnim obciążeniu w teście progresywnym oraz po 1 minucie i po 14 minutach po tej próbie wysiłkowej. Spożycie CAF zwiększyło w tym przypadku stężenie CAF w osoczu do około 7,8 µg/mL przed 8-kilometrowym C-PT, a poziom CAF – podobnie jak w badaniach prowadzonych w ramach niniejszego projektu doktorskiego – utrzymywał się na tym samym poziomie przez cały okres testu wysiłkowego (Stadheim i in. 2013). W badaniu Mesquity i in. (2020) próbki krwi pobierano po spożyciu 6 mg_{CAF}/kg_{BM}, bezpośrednio po protokole do wyczerpania oraz 6 godzin po spożyciu. Wyniki tego badania wykazały, że stężenie CAF w surowicy krwi rosło z czasem, osiągając szczytowy poziom ~8,51 µg/mL po 60 minutach, co nie zostało w pełni potwierdzone w danych przedstawionych w publikacji 2. Warto jednak zauważyć, że we wspomnianym badaniu CAF podawano w formie kapsułek, a nie w postaci rozpuszczonego proszku, jak w badaniu opisanym w publikacji 2. Ponadto stężenie w surowicy krwi obniżyło się znacznie po „protokole do wyczerpania” (zestawy 40 bilateralnych skoków z odbiciem do wyczerpania) oraz po 6 godzinach. Bell i in. (Bell i McLellan 2002) oceniali czas trwania ergogenicznego efektu CAF po spożyciu 5 mg_{CAF}/kg_{BM} i zaobserwowali znacząco podwyższone stężenie CAF w osoczu podczas całego okresu wysiłku. Poziom ten pozostał stabilny w kolejnych próbach przeprowadzonych 3 godziny i 6 godzin po spożyciu, aczkolwiek stężenie CAF po 1 godzinie i po 3 godzinach po spożyciu było wyższe niż dla próby przeprowadzonej 6 godzin po spożyciu. W bardziej złożonym badaniu przeprowadzonym przez Conway i in. (2003) uczestnicy (kolarze i triathloniści) przyjęli odpowiednio 3 lub 6 mg_{CAF}/kg_{BM} (kapsułki) lub *PLA* 60 minut przed wysiłkiem oraz dodatkowe 3 mg_{CAF}/kg_{BM} (gdzie wcześniejsza dawka wynosiła również 3 mg_{CAF}/kg_{BM}) 45 minut po rozpoczęciu wysiłku. Próbki krwi pobierano w tym przypadku przed suplementacją, 30 i 60 minut po pierwszej suplementacji oraz dodatkowo 30, 45, 60 i 90 minut po rozpoczęciu wysiłku i po jego zakończeniu (120 minut po jego rozpoczęciu). Stężenie CAF w osoczu – podobnie jak opisano to w publikacji 2 – wzrastało w sposób zależny od dawki. Poziom CAF był znacząco wyższy po 30 minutach, ale w grupie o wyższej dawce wartość szczytową osiągnął po 90 minutach. W grupie uczestników przyjmujących niższą dawkę CAF wykazano początkową wartość szczytową stężenia po 30 minutach, po czym nastąpiło powolne obniżenie aż do momentu podaży kolejnej (drugiej) dawki CAF. Dodatkowo stężenie CAF było istotnie wyższe w grupie stosującej wyższą dawkę aż do 60 minuty wysiłku, kiedy to stężenia były podobne (Conway i in. 2003). W badaniu Skinnera i in. (2013b) 14 kolarzy i triathlonistów zażyło 6 mg_{CAF}/kg_{BM} lub *PLA* 60 minut przed 40-kilometrowym wyścigiem lub rozpoczęło próbę wysiłkową przy indywidualnej wartości szczytowej stężenia CAF określonej podczas wcześniejszej sesji „profilowania CAF”, obejmującej monitorowanie stężenia CAF w surowicy co 30 minut przez 4 godziny. Co zaskakujące, wartość szczytowa stężenia CAF (~6,4 µg/mL) wystąpiła w tym przypadku dopiero po 120–150 minutach od spożycia, jednak znaczącą poprawę wydolności odnotowano już wcześniej – gdy CAF pobierano 60 minut przed wysiłkiem. Skłoniło to badaczy do konkluzji, że ergogeniczny efekt CAF może nie być związany z wartością szczytową stężenia CAF w surowicy krwi na początku wysiłku wytrzymałościowego. W jednym z kolejnych badań przeprowadzonych przez Skinnera i in. (2014) wykazano, że najwyższe stężenie CAF w surowicy krwi (~6,79 µg/mL) zostało osiągnięte dopiero po 120–180 minutach od spożycia 6 mg_{CAF}/kg_{BM}. Z kolei w badaniach,

w których analizowano stężenie CAF w surowicy w sześciu punktach czasowych w ciągu 4 godzin po spożyciu 6 lub 9 mg_{CAF}/kg_{BM} (na czczo vs w warunkach poposiłkowych), wykazano, że najwyższe stężenie CAF osiągnięto 60 minut po jej spożyciu na czczo, w porównaniu ze stężeniem osiągniętym 120 minut i 180 minut po jednoczesnym zażyciu CAF z węglowodanami (Skinner i in. 2013a). Co więcej, wyższa dawka CAF spowodowała wyższe wartości szczytowe stężenia CAF w stanie po posiłku aniżeli umiarkowana dawka przyjęta na czczo. Autorzy tej pracy zakładali, że jeśli sportowiec spożyje posiłek w ciągu 60 minut przed rozpoczęciem wysiłku, może potrzebować wyższej dawki podawanej CAF, aby osiągnąć takie samo stężenie w surowicy krwi jak w przypadku umiarkowanej dawki przyjętej na czczo. Ponadto w badaniu Davenporta i in. (2020) oceniano optymalny moment przyjęcia suplementu zawierającego 200 mg CAF w kontekście wydolności fizycznej: (a) 35 minut przed 30-minutowym wysiłkiem na cykloergometrze o stałej intensywności (SS); (b) na początku SS; lub (c) bezpośrednio przed 15-minutową próbą czasową. Próbkę krwi pobrano w pięciu różnych punktach czasowych. Autorzy tych badań zaobserwowali, że zwiększenie stężenia CAF w osoczu nastąpiło we wszystkich warunkach eksperymentalnych i wystąpił istotny statystycznie efekt interakcji dawki i momentu przyjęcia CAF, przy czym najwyższe wartości występowały niejednorodnie – w różnych punktach czasowych (Davenport i in. 2020). Ponadto, chociaż przyjęcie 1,5–3 mg_{CAF}/kg_{BM} około 60 minut przed próbą czasową na cykloergometrze może poprawić wydolność fizyczną (Talanian i Spriet 2016), te same dawki przyjęte około 180 minut przed testem nie prowadzą do podobnych rezultatów (Desbrow i Leveritt 2006). To spostrzeżenie sugeruje, że podwyższone stężenie CAF we krwi nie jest jedynym mechanizmem wpływającym na poprawę wydolności, lecz odpowiedzialny za to jest raczej optymalny czas spożycia CAF – zwłaszcza w przypadku przyjęcia niskiej dawki CAF.

W wynikach zaprezentowanych w publikacji 2 zaobserwowano, że podaż CAF prowadziła do wzrostu stężenia PRX w surowicy krwi, przy czym efekt ten był największy już po 60 minutach w przypadku dawki *HIGH*. Należy podkreślić, że w tematyce wysiłku fizycznego dostępne są jedynie nieliczne badania oceniające stężenie PRX po spożyciu CAF. Między innymi Simmonds i in. (2010) wykazali istotne zwiększenie stężenia PRX w osoczu ($p = 0,006$) po 60 minutach od spożycia 5 mg_{CAF}/kg_{BM} w porównaniu z *PLA*. W badaniach Conway i in. (2003) – podobnie jak wykazano to w publikacji 2 – stężenie PRX w osoczu było istotnie wyższe w grupie przyjmującej wyższą dawkę CAF. Cytowani autorzy odnotowali jednak wolniejsze tempo wzrostu PRX i brak swoistych wartości szczytowych, ponieważ stężenie PRX nadal rosło podczas prowadzonego wysiłku (Conway i in. 2003). Co więcej, stężenie PRX było wyższe w warunkach na czczo, co sugeruje, że niższe stężenie PRX po posiłku może ograniczać ergogeniczny potencjał CAF (Skinner i in. 2013a). Podobnie Davenport i in. (2020) wykazali, że stężenie PRX w osoczu wzrastało w trakcie trwania badania. Chociaż stężenie CAF było podwyższone zarówno przed testem wysiłkowym, jak i podczas testu, stężenie PRX wzrastało istotnie jedynie wtedy, gdy suplement został przyjęty 35 minut przed próbą czynnościową. Tę strategię obecnie wskazuje się jako najbardziej optymalną w kontekście potencjalnego efektu ergogenicznego (Davenport i in. 2020).

Analizując wyniki stężenia CAF i PRX w ślinie, opisane w publikacji 2, wykazano, że zmiana stężenia CAF w tej próbce materiału biologicznego była również największa w przypadku zastosowania dawki *HIGH*. Szczytowy wzrost stężenia nastąpił po 30 minutach od zażycia CAF, jednak w przeciwieństwie do wyników badań surowicy krwi zaobserwowano dalsze istotne różnice między kolejnymi punktami czasowymi, co sugeruje niższą stabilność CAF w ślinie, prawdopodobnie pod wpływem innych czynników. Ponadto każda z podawanych dawek CAF zwiększyła stężenie PRX w ślinie, przy czym

najwyższe zmiany obserwowano po dawce *HIGH*. Co zaskakujące, szczytowe stężenie PRX w ślinie nie zostało osiągnięte w 60 minucie dla każdej dawki, ale stopniowo wzrastało aż do 90 minuty. W badaniu Zawiei i in. (2023), w którym mierzono PRX w ślinie pobranej przed suplementacją, 45 minut po przyjęciu $5 \text{ mg}_{\text{CAF}}/\text{kg}_{\text{BM}}$ oraz po wysiłku (120 minut po przyjęciu), aby ocenić stężenie CAF i PRX, stężenie tej pierwszej substancji wzrosło 30-krotnie i było około 20 razy wyższe niż w próbie *PLA* 45 minut po spożyciu, po czym uległo obniżeniu po wysiłku. Z kolei stężenie PRX wzrosło 2,5-krotnie 45 minut po spożyciu i zwiększało się w dalszym stopniu do kolejnego punktu pomiarowego.

Warto zauważyć, że opisane w publikacji 2 zmiany stężenia CAF w surowicy krwi nie różniły się znacząco statystycznie między 30 a 60 minutą, co wskazuje na możliwość wcześniejszego osiągnięcia swoistego *plateau*, w wyniku czego szczytowe stężenie CAF wystąpiło przed rozpoczęciem wysiłku. Davenport i in. (2020) zaobserwowali taki efekt po około 50 minutach od spożycia CAF, co jednak odbiega znacznie od wyników innych badań, które wykazały wartości szczytowe stężenia CAF między 75 a 120 minutą po suplementacji (Conway i in. 2003; Kamimori i in. 2002; Kovacs i in. 1998). Ponadto w literaturze zasugerowano, że poprawa wydolności fizycznej wynikająca ze zmniejszenia odczuwalnego wysiłku może być efektem oddziaływania nie tylko CAF, ale również zwiększonego stężenia PRX (Davenport i in. 2020). Wydaje się zatem zasadne założenie, że obniżeniu stężenia CAF we krwi może towarzyszyć wzrost stężenia PRX bez oznak *plateau* nawet po 180 minutach (Conway i in. 2003). Wzrost PRX we krwi następuje bowiem wolniej niż CAF w ciągu pierwszych 60 minut (Lajin i in. 2021).

Dodatkowo, na podstawie uzyskanych wyników, w publikacji 2 przeanalizowano aktywność enzymu CYP1A2 za pomocą średniego czasowo skorygowanego PRX/CAF RATIO w ślinie i nie wykazano zależności od dawki CAF. Wcześniej do pomiaru aktywności enzymu CYP1A2 stosowano różne ludzkie matryce biologiczne, takie jak mocz, osocze, surowica i ślina, a jak nadmieniono w części literaturowej, CAF była używana jako sonda. Stosunek stężenia PRX/CAF w jednym punkcie czasowym koreluje z widocznym klirensiem CAF (Perera i in. 2010). Fenotypowanie metaboliczne oparte na wskaźniku PRX/CAF RATIO wykazuje zależność czasową (stosunek rosnący wraz z upływem czasu) i wyraźną zależność od dawki CAF (mniejsze dawki CAF zwiększają stosunek metaboliczny) (Grzegorzewski i in. 2022). Pomimo że wykazano, iż do wiarygodnej oceny aktywności enzymu CYP1A2 nie jest potrzebna 24-godzinna abstynencja od CAF (Perera i in. 2011), w badaniach własnych aspekt ten był wystandaryzowany i uczestnicy nie przyjmowali produktów zawierających CAF. Tak zwanym złotym standardem w ocenie aktywności CYP1A2 jest molarny stosunek PRX/CAF w ślinie 6 godzin po przyjęciu CAF, ponieważ najlepiej koreluje to z wewnętrznym klirensem (Fuhr i in. 1996; Urry i in. 2016). Na podstawie tych danych Urry i in. (2016) opracowali metodę umożliwiającą dostosowanie wartości aktywności CYP1A2 do optymalnych („referencyjnych”) wartości (wymagających pobrania próbek po 6 godzinach od przyjęcia CAF). Ta nowatorska technika uwzględnia różne odstępy czasowe między spożyciem CAF a pobraniem śliny. W badaniu Perery i in. (2011) ilościowo określono stężenie CAF w osoczu krwi i ślinie w różnych punktach czasowych po spożyciu 100 mg CAF. Nie stwierdzono jednak istotnej różnicy między stosunkiem $\text{AUC}_{0-24} \text{ PRX/CAF}$ w osoczu i ślinie podczas okresu abstynencji od CAF (odpowiednio 0,79 i 0,78) oraz bez abstynencji (odpowiednio 0,83 i 0,85). Zwłaszcza PRX/CAF RATIO po 4 godzinach wykazał silną korelację ze wszystkimi wskaźnikami referencyjnymi, takimi jak klirens CAF czy PRX/CAF RATIO w osoczu krwi. Ponadto badanie przeprowadzone z udziałem zdrowych mężczyzn i kobiet (Nordmark i in. 1999), oceniające CAF jako sondę dla aktywności enzymu CYP1A2, nie wykazało dowodów na zależność od przyjmowanej

dawki CAF. Stwierdzono również, że nawet przy wysokim spożyciu CAF stężenie w stanie równowagi jest zbyt niskie, aby nasycić metabolizm mediowany przez CYP1A2 (Perera i in. 2012). W odniesieniu do codziennego spożycia kawy stwierdzono, że osoby pijące zwykle więcej niż trzy filiżanki dziennie mają znacznie wyższą normalną aktywność enzymu CYP1A2 niż osoby pijące mniej. Odkrycie to sugeruje, że zaprzestanie regularnego spożycia CAF przed pomiarem aktywności CYP1A2 może spowodować jej obniżenie w trakcie badania i skutkować brakiem odzwierciedlenia zwyczajowej aktywności CYP1A2 danej osoby (Perera i in. 2012).

W publikacji 2 analizowano funkcjonalny polimorfizm rs762551 genu *CYP1A2*, jednak nie stwierdzono interakcji z aktywnością enzymu CYP1A2. Wspomniany SNP jest determinantem indukowalnej aktywności CYP1A2, dzięki czemu genotypy można oznaczyć jako „wysoce indukowane” (AA) oraz „mniej indukowane” (AC, CC) (Han i in. 2001; Urry i in. 2016). Zgodnie z danymi literaturowymi, homozygoty AA mogą szybciej metabolizować CAF i doświadczać dzięki temu większego efektu ergogenicznego (Guest i in. 2018). Wydaje się, że PRX może być silniejszym antagonistą receptorów adenylinowych, a jej poziom wzrasta wcześniej u osób z genotypem AA (Davenport i in. 2020). Niemniej kilku autorów badań (Dobrinas i in. 2011; Gunes i in. 2009; Gunes i Dahl 2008; Tian i in. 2019; Urry i in. 2016) wykazało, że ten SNP nie ma istotnego wpływu na aktywność enzymu CYP1A2 mierzoną PRX/CAF RATIO lub średnim czasowo skorygowanym PRX/CAF RATIO, co wskazuje, że SNP *CYP1A2* może nie być solidnym predyktorem fenotypu CYP1A2. Genotyp -163C>A koreluje bowiem z RATIO tylko u palaczy wyrobów tytoniowych (Gunes i in. 2009), ponieważ wyraźniejszy wzrost aktywności enzymu CYP1A2 spowodowany tą zmiennością genetyczną obserwowano jedynie u osób palących. Wykazano, że palacze z genotypem -163C/C mają o 40% niższy PRX/CAF RATIO w osoczu krwi niż osoby z genotypem -163A/A, podczas gdy u osób niepalących nie zaobserwowano takiego wpływu (Gunes i Dahl 2008). Ponadto, zgodnie z tezą zaproponowaną przez Davenporta i in. (2020), regularny wysiłek fizyczny zwiększa ekspresję CYP1A2, a więc osoby „wolno metabolizujące” mogą być w stanie przezwyciężyć wszelkie „niekorzystne” w tym względzie cechy genetyczne dzięki aktywności fizycznej, a tym samym wystarczająco zwiększyć aktywność enzymu CYP1A2.

6.1. Ograniczenia projektu

Publikacje 1 i 2

W interpretacji wyników niniejszego projektu doktorskiego należy uwzględnić pewne ograniczenia towarzyszące wykonywanym badaniom. Po pierwsze, oceniono wpływ suplementacji CAF u średnio wytrenowanych osób aktywnych fizycznie. Możliwe, że efekt CAF różni się w zależności od doświadczenia treningowego i że wysoko wytrenowani zawodnicy, zwłaszcza na poziomie elitarnym, mogą odznaczać się większą podatnością na działanie CAF, co wykazano we wcześniejszym badaniu wśród judoków (Durkalec-Michalski i in. 2019). Warto jednak zauważyć, że CrossFit/HIFT zyskał popularność na całym świecie, a większość uczestników trenuje na poziomie amatorskim. Z tego względu uznano, że szczególnie ważne jest opracowanie nowych strategii wspomagania ergogenicznego właśnie w przypadku tej grupy sportowców. Po drugie, innym ograniczeniem projektu był brak możliwości przeprowadzenia analiz różnicujących wpływ CAF w zależności od płci, z powodu nierównych pod względem liczbowym grup kobiet i mężczyzn. Powyższe wynikało z niechęci kobiet do udziału w tym protokole wymagającym bardzo obciążającego wysiłku, jakim był test FGB. Ponadto, mimo że obliczono i spełniono minimalną

wymaganą wielkość próby, większa liczba uczestników mogłaby uwidocznić pewne statystycznie istotne różnice uzyskanych wyników.

Publikacja 1

Zaobserwowano efekt praktyki w teście FGB pomiędzy kolejnymi wizytami badawczymi, co wcześniej zauważył również Stein i in. (2020) u osób trenujących CrossFit. Niektórzy autorzy (Glaister 2008) zalecają przynajmniej dwie wizyty służące zapoznaniu się z protokołem, aby zmniejszyć wpływ tego efektu, zwłaszcza u osób nieprzyzwyczajonych do protokołów wysiłkowych. Jednak w przeciwieństwie do innych badań uczestnicy niniejszego projektu doktorskiego byli dobrze zaznajomieni z poszczególnymi wykonywanymi ćwiczeniami, co powinno w tym względzie wyeliminować efekt nauki. Niemniej przeprowadzono dodatkowo jedną wizytę „familiarizacyjną”, aby uczestnicy mogli zapoznać się ze sprzętem i warunkami laboratoryjnymi. Pomimo efektu praktyki poprawa wyników testu wysiłkowego po CAF może mieć jednak wpływ na rezultaty podczas zawodów.

Publikacja 2

Stężenia CAF i PRX poddano analizie w różnych momentach w stosunkowo krótkim przedziale czasowym (0–90 minut); brak długoterminowego poboru próbek uniemożliwił pomiar pola pod krzywą (AUC) oraz potencjalnego szczytowego stężenia PRX, które prawdopodobnie występuje później niż po 90 minutach. Co więcej, pomiar PRX/CAF RATIO wyłącznie w określonych punktach czasowych mógł wpłynąć na dokładność oceny aktywności enzymu CYP1A2. Wiadomo, że próbki pobrane na wczesnym lub późnym etapie są najmniej odpowiednie do fenotypowania, ponieważ niskie stężenie CAF w tych momentach może prowadzić do stosunkowo dużych losowych błędów. Ponadto na tym wczesnym etapie faza dystrybucji, wchłanianie oraz kinetyka substancji mogą wpływać na wynik wskaźników metabolicznych. Fenotypowanie metaboliczne przy użyciu PRX/CAF RATIO jest silnie zależne od czasu (stosunek wzrasta z czasem), a mniejsze dawki CAF zwiększają stosunek metaboliczny (co tłumaczy wyraźnie wyższe wartości dla *BASE* i *PLA*) (Grzegorzewski i in. 2022; Lajin i in. 2021; Urry i in. 2016). Jednakże autorka niniejszej dysertacji była świadoma tej kwestii metodologicznej i celowo zastosowała uprzednio opracowaną metodę dostosowania aktywności enzymu CYP1A2 do optymalnego punktu czasowego 6 godzin po podaniu CAF (Urry i in. 2016). Ponadto wyniki dotyczące genotypów *CYP1A2* należy interpretować z ostrożnością ze względu na stosunkowo małą liczbę osób „szybko metabolizujących” wśród badanych. Niemniej zgodnie z zasadą Hardy’ego–Weinberga, częstość genotypów *CYP1A2* w populacji wynosi około 45% dla AA, 45% dla AC i 10% dla CC (Saunders i in. 2023).

6.2. Mocne strony projektu

Publikacje 1 i 2

Mocną stroną niniejszego projektu doktorskiego były metodyka, zwłaszcza zastosowanie modelu badań krzyżowych, w których podawano trzy różne dawki CAF, jak również *PLA*, u osób trenujących CrossFit/HIFT. Po drugie, uwzględniono SNP *CYP1A2* i *ADORA2A* oraz ich rolę w ergogenicznych efektach podaży CAF. Po trzecie, zastosowany 7-dniowy okres „wyplukiwania” był wystarczający, bowiem okres półtrwania CAF wynosi 2,5–10 godzin (Guest i in. 2021). Ponadto, ze względu na protokoły badań przeprowadzane o tej samej porze dnia dla poszczególnego uczestnika, ograniczono wpływ rytmu okołodobowego na aktywność CAF i zapewniono odpowiednią standaryzację. Obliczono również minimal-

ną wymaganą wielkość próby, na podstawie której określono liczbę uczestników badań. Wszyscy badani byli regularnymi konsumentami produktów zawierających CAF, którzy powstrzymali się od ich spożycia przed wizytami testowymi. Ograniczyło to ewentualny wpływ produktów zawierających CAF na rejestrowane wyniki. Zadbano również o pełne przestrzeganie przyjmowania suplementów oraz o dokładną standaryzację procedur.

Dodatkowo w publikacji 2 autorka niniejszej pracy doktorskiej przeanalizowała stężenia CAF i PRX zarówno w surowicy krwi i ślinie w różnych punktach czasowych u średnio wytrenowanych osób, jak i oszacowała aktywność enzymu CYP1A2, co stanowiło nowatorskie podejście. Biorąc pod uwagę możliwość wyjściowego stężenia CAF wyższego niż „zero” przed suplementacją, oceniono wpływ CAF na zmiany w stężeniu CAF i PRX od tego punktu. Ponadto zastosowano model regresji ślina–surowica, który częściowo uwzględnił zmiany stężenia CAF i PRX w czasie zarówno w ślinie (stężenie „malejące”), jak i w surowicy (stężenie bardziej „stabilne”).

7. WNIOSKI

Uzyskanie wyniki badań (publikacja 1) nie potwierdziły zależnego od dawki efektu suplementacji CAF u średnio wytrenowanych uczestników CrossFit/HIFT. Nie wykazano różnic między dawkami CAF a PLA w zakresie specyficznych zdolności wysiłkowych, czasu reakcji, stabilności posturalnej, subiektywnego odczucia zmęczenia ani częstości skurczów serca, jak również w kontekście polimorfizmów genów *CYP1A2* i *ADORA2A*. Niemniej dawka *MEDIUM* CAF ($6 \text{ mg}_{\text{CAF}}/\text{kg}_{\text{BM}}$) przyniosła zauważalną ze sportowego punktu widzenia poprawę wyników testu FGB, R_{Time} i M_{Time} . Wskazuje to, że z praktycznego i sportowego punktu widzenia ta dawka może być najskuteczniejszą formą wspomagania ergogenicznego u osób trenujących CrossFit.

Uzyskane wyniki badań (publikacja 2) potwierdziły zależne od dawki i czasu efekty suplementacji CAF na stężenie CAF i PRX w surowicy krwi i ślinie u osób trenujących CrossFit/HIFT. Ponadto największy wzrost stężenia CAF zaobserwowano 30 minut po jej spożyciu, co sugeruje rozbieżności w stosunku do obecnych zaleceń dotyczących procedur suplementacji CAF. Dodatkowo wcześniejsze *plateau* CAF oraz możliwe stosunkowo późne *plateau* PRX zaobserwowane w niniejszych badaniach mogą stanowić istotne wskazania naukowe i praktyczne. Nie stwierdzono jednak wpływu dawki CAF na aktywność enzymu CYP1A2 ani interakcji genotypów *CYP1A2* z indukowalnością enzymu. Ostatecznie zaobserwowano korelację między stężeniem CAF i PRX w surowicy krwi i ślinie, co wskazuje na możliwość wykorzystania mniej inwazyjnego poboru śliny jako metody alternatywnej dla poboru krwi w badaniach sportowych.

Przyszłe projekty badawcze powinny skupić się na jednoczesnych pomiarach CAF i jej metabolitów w kontekście wydolności fizycznej i zdolności wysiłkowych oraz na możliwości osiągnięcia szczytowego stężenia na późniejszych etapach trwającego wysiłku, czyli wówczas, gdy pojawiają się nasilone symptomy zmęczenia.

8. PIŚMIENNICTWO

- Ali A., O'Donnell J., Von Hurst P., Foskett A., Holland S., Starck C., Rutherford-Markwick K. (2016) Caffeine ingestion enhances perceptual responses during intermittent exercise in female team-game players. *Journal of Sports Sciences*, 34 (4), 330–341. <https://doi.org/10.1080/02640414.2015.1052746>
- Anderson N., Robinson D.G., Verhagen E., Fagher K., Edouard P., Rojas-Valverde D., Ahmed O.H., Jederström M., Usacka L., Benoit-Piau J., Foelix C.G., Akinyi Okoth C., Tsiouti N., Moholdt T., Pinheiro L., Hendricks S., Hamilton B., Magnani R., Badenhorst M., Belavy D.L. (2023). Under-representation of women is alive and well in sport and exercise medicine: what it looks like and what we can do about it. *BMJ Open Sport & Exercise Medicine*, 5, 9 (2), e001606. <https://doi.org/10.1136/bmjsem-2023-001606>
- Arnaud M.J. (2011) Pharmacokinetics and metabolism of natural methylxanthines in animal and man. W: B.B. Fredholm (ed.), *Methylxanthines. Handbook of Experimental Pharmacology*, 200. Berlin: Springer, 33–91. https://doi.org/10.1007/978-3-642-13443-2_3
- Baláková V., Boschek P., Skalíková L. (2015) Selected cognitive abilities in elite youth soccer players. *Journal of Human Kinetics*, 49, 267–276. <https://doi.org/10.1515/hukin-2015-0129>
- Barreto G., Esteves G.P., Marticorena F., Oliveira T.N., Grgic J., Saunders B. (2024) Caffeine, CYP1A2 genotype, and exercise performance: a systematic review and meta-analysis. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 56 (2), 328–339. <https://doi.org/10.1249/MSS.00000000000003313>
- Barreto G., Grecco B., Merola P., Reis C.E.G., Gualano B., Saunders B. (2021) Novel insights on caffeine supplementation, CYP1A2 genotype, physiological responses and exercise performance. *European Journal of Applied Physiology*, 121 (3), 749–769. <https://doi.org/10.1007/s00421-020-04571-7>
- Bell D.G., McLellan T.M. (2002) Exercise endurance 1, 3, and 6 h after caffeine ingestion in caffeine users and nonusers. *Journal of Applied Physiology*, 93 (4), 1227–1234. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00187.2002>
- Bello M.L., Walker A.J., McFadden B.A., Sanders D.J., Arent S.M. (2019) The effects of TeaCrine® and caffeine on endurance and cognitive performance during a simulated match in high-level soccer players. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 16 (1), 20. <https://doi.org/10.1186/s12970-019-0287-6>
- Ben Waer F., Laatar R., Srihi S., Jouira G., Rebai H., Sahli S. (2021) Acute effects of low versus high caffeine dose consumption on postural balance in middle-aged women. *Journal of Women & Aging*, 33 (6), 620–634. <https://doi.org/10.1080/08952841.2020.1735288>
- Benjamim C.J.R., Kliszczewicz B., Garner D.M., Cavalcante T.C.F., da Silva A.A.M., Santana M.D.R., Valenti V.E. (2020) Is caffeine recommended before exercise? A systematic review to investigate its impact on cardiac autonomic control via heart rate and its variability. *Journal of the American College of Nutrition*, 39 (6), 563–573. <https://doi.org/10.1080/07315724.2019.1705201>
- Benowitz N.L., Jacob III P., Mayan H., Denaro C. (1995) Sympathomimetic effects of paraxanthine and caffeine in humans. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 58 (6), 684–691. [https://doi.org/10.1016/0009-9236\(95\)90025-X](https://doi.org/10.1016/0009-9236(95)90025-X)

- Black C.D., Waddell D.E., Gonglach A.R. (2015) Caffeine's ergogenic effects on cycling: neuromuscular and perceptual factors. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 47 (6), 1145–1158. <https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000000513>
- Blanchard J., Sawers S.J. (1983) Comparative pharmacokinetics of caffeine in young and elderly men. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, 11 (2), 109–126. <https://doi.org/10.1007/BF01061844>
- Bonnet C.T. (2016) Advantages and disadvantages of stiffness instructions when studying postural control. *Gait & Posture*, 46, 208–210. <https://doi.org/10.1016/j.gaitpost.2015.12.026>
- Borg G. (1998) Borg's perceived exertion and pain scales. Champaign: Human Kinetics.
- Briggs I., Chidley J.B., Chidley C., Osler C.J. (2021) Effects of caffeine ingestion on human standing balance: a systematic review of placebo-controlled trials. *Nutrients*, 13 (10), 3527. <https://doi.org/10.3390/nu13103527>
- Bunsawat K., White D.W., Kappus R.M., Baynard T. (2015) Caffeine delays autonomic recovery following acute exercise. *European Journal of Preventive Cardiology*, 22 (11), 1473–1479. <https://doi.org/10.1177/2047487314554867>
- Caetano M.L., Souza M.L.R., Loureiro L.L., Capistrano Junior V.L.M. (2023) The effects of acute caffeine supplementation on performance in trained CrossFit® athletes: a randomized, double-blind, placebo-controlled, and crossover trial. *Science & Sports*, 38 (7), 701–707. <https://doi.org/10.1016/j.scispo.2022.04.007>
- Carswell A.T., Howland K., Martinez-Gonzalez B., Baron P., Davison G. (2020) The effect of caffeine on cognitive performance is influenced by CYP1A2 but not ADORA2A genotype, yet neither genotype affects exercise performance in healthy adults. *European Journal of Applied Physiology*, 120 (7), 1495–1508. <https://doi.org/10.1007/s00421-020-04384-8>
- Church D.D., Hoffman J.R., LaMonica M.B., Riffe J.J., Hoffman M.W., Baker K.M., Varanoske A.N., Wells A.J., Fukuda D.H., Stout J.R. (2015) The effect of an acute ingestion of Turkish coffee on reaction time and time trial performance. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 12, 37. <https://doi.org/10.1186/s12970-015-0098-3>
- Collomp K., Anselme F., Audran M., Gay J.P., Chanal J.L., Prefaut C. (1991) Effects of moderate exercise on the pharmacokinetics of caffeine. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 40 (3), 279–282. <https://doi.org/10.1007/BF00315209>
- Conway K.J., Orr R., Stannard S.R. (2003) Effect of a divided caffeine dose on endurance cycling performance, postexercise urinary caffeine concentration, and plasma paraxanthine. *Journal of Applied Physiology* (Bethesda, Md.: 1985), 94 (4), 1557–1562. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00911.2002>
- Crawford D.A., Drake N.B., Carper M.J., DeBlauw J., Heinrich K.M. (2018) Validity, reliability, and application of the session-RPE method for quantifying training loads during high intensity functional training. *Sports* (Basel, Switzerland), 6 (3), 84. <https://doi.org/10.3390/sports6030084>
- Crowe M.J., Leicht A.S., Spinks W.L. (2006) Physiological and cognitive responses to caffeine during repeated, high-intensity exercise. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, 16 (5), 528–544. <https://doi.org/10.1123/ijnsnem.16.5.528>
- Davenport A.D., Jameson T.S.O., Kilroe S.P., Monteyne A.J., Pavis G.F., Wall B.T., Dirks M.L., Alamdari N., Mikus C.R., Stephens F.B. (2020) A randomised, placebo-controlled, crossover study investigating the optimal timing of a caffeine-containing supplement for exercise performance. *Sports Medicine – Open*, 6 (1), 17. <https://doi.org/10.1186/s40798-020-00246-x>

- Davis J.K., Green J.M. (2009) Caffeine and anaerobic performance: ergogenic value and mechanisms of action. *Sports Medicine*, 39 (10), 813–832. <https://doi.org/10.2165/11317770-000000000-00000>
- Desbrow B., Barrett C.M., Minahan C.L., Grant G.D., Leveritt M.D. (2009) Caffeine, cycling performance, and exogenous CHO oxidation: a dose-response study. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 41 (9), 1744–1751. <https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e3181a16cf7>
- Desbrow B., Leveritt M. (2006) Awareness and use of caffeine by athletes competing at the 2005 Ironman Triathlon World Championships. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, 16 (5), 545–558. <https://doi.org/10.1123/ij-snem.16.5.545>
- Dexheimer J.D., Schroeder E.T., Sawyer B.J., Pettitt R.W., Aguinaldo A.L., Torrence W.A. (2019) Physiological performance measures as indicators of CrossFit® performance. *Sports (Basel, Switzerland)*, 7 (4), 93. <https://doi.org/10.3390/sports7040093>
- Dobrinas M., Cornuz J., Oneda B., Kohler Serra M., Puhl M., Eap C.B. (2011) Impact of smoking, smoking cessation, and genetic polymorphisms on CYP1A2 activity and inducibility. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 90 (1), 117–125. <https://doi.org/10.1038/clpt.2011.70>
- Doherty M., Smith P.M. (2005) Effects of caffeine ingestion on rating of perceived exertion during and after exercise: a meta-analysis. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 15 (2), 69–78. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0838.2005.00445.x>
- Doude van Troostwijk L.J.A.E., Koopmans R.P., Guchelaar H.-J. (2003) Two novel methods for the determination of CYP1A2 activity using the paraxanthine/caffeine ratio. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 17 (3), 355–362. <https://doi.org/10.1046/j.1472-8206.2003.00136.x>
- Duncan M.J., Oxford S.W. (2011) The effect of caffeine ingestion on mood state and bench press performance to failure. *Journal of Strength and Conditioning Research*, 25 (1), 178–185. <https://doi.org/10.1519/JSC.0b013e318201bddd>
- Durkalec-Michalski K., Domagalski A., Głowska N., Kamińska J., Szymczak D., Podgórski T. (2022) Effect of a four-week vegan diet on performance, training efficiency and blood biochemical indices in CrossFit-trained participants. *Nutrients*, 14 (4), 894. <https://doi.org/10.3390/nu14040894>
- Durkalec-Michalski K., Głowska N., Podgórski T., Szymocha M., Przybylik B., Wochna K., Woźniewicz M., Nowaczyk P.M. (2024) Does Colostrum Bovinum supplementation affect swimming performance in endurance-trained males? A randomized placebo-controlled crossover study. *Nutrients*, 16 (18), 3204. <https://doi.org/10.3390/nu16183204>
- Durkalec-Michalski K., Kamińska J., Saunders B., Pokrywka A., Łoniewski I., Steffl M., Podgórski T. (2023) Does sodium bicarbonate based extra-cellular buffering support reduce high intensity exercise-induced fatigue and enhance short-term recovery assessed by selected blood biochemical indices? *Biology of Sport*, 41 (1), 17–27. <https://doi.org/10.5114/biolsport.2024.125591>
- Durkalec-Michalski K., Nowaczyk P.M., Głowska N., Grygiel A. (2019) Dose-dependent effect of caffeine supplementation on judo-specific performance and training activity: a randomized placebo-controlled crossover trial. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 16 (1), 38. <https://doi.org/10.1186/s12970-019-0305-8>
- Durkalec-Michalski K., Zawieja E.E., Podgórski T., Łoniewski I., Zawieja B.E., Warzybok M., Jeszka J. (2018) The effect of chronic progressive-dose sodium bicarbonate ingestion on CrossFit-like performance: a double-blind, randomized cross-over trial. *PLOS ONE*, 13 (5), e0197480. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197480>

- Durkalec-Michalski K., Zawieja E.E., Zawieja B.E., Podgórski T. (2021) Evaluation of the repeatability and reliability of the cross-training specific Fight Gone Bad workout and its relation to aerobic fitness. *Scientific Reports*, 11, 7263. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86660-x>
- Feito Y., Heinrich K.M., Butcher S.J., Poston W.S.C. (2018) High-Intensity Functional Training (HIFT): definition and research implications for improved fitness. *Sports (Basel, Switzerland)*, 6 (3). <https://doi.org/10.3390/sports6030076>
- Fogaça L.J., Santos S.L., Soares R.C., Gentil P., Naves J.P., Dos Santos W.D., Pimentel G.D., Bortaro M., Mota J.F. (2020) Effect of caffeine supplementation on exercise performance, power, markers of muscle damage, and perceived exertion in trained CrossFit men: a randomized, double-blind, placebo-controlled crossover trial. *The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*, 60 (2), 181–188. <https://doi.org/10.23736/s0022-4707.19.10043-6>
- Fuhr U., Rost K.L. (1994) Simple and reliable CYP1A2 phenotyping by the paraxanthine/caffeine ratio in plasma and in saliva. *Pharmacogenetics*, 4 (3), 109–116. <https://doi.org/10.1097/00008571-199406000-00001>
- Fuhr U., Rost K.L., Engelhardt R., Sachs M., Liermann D., Belloc C., Beaune P., Janezic S., Grant D., Meyer U.A., Staib A.H. (1996) Evaluation of caffeine as a test drug for CYP1A2, NAT2 and CYP2E1 phenotyping in man by in vivo versus in vitro correlations. *Pharmacogenetics*, 6 (2), 159–176. <https://doi.org/10.1097/00008571-199604000-00003>
- Fulton J.L., Dinas P.C., Carrillo A.E., Edsall J.R., Ryan E.J., Ryan E.J. (2018) Impact of genetic variability on physiological responses to caffeine in humans: a systematic review. *Nutrients*, 10 (10), 1373. <https://doi.org/10.3390/nu10101373>
- Giersch G.E.W., Boyett J.C., Hargens T.A., Luden N.D., Saunders M.J., Daley H., Hughey C.A., El-Sohemy A., Womack C.J. (2018) The effect of the CYP1A2 –163 C > A polymorphism on caffeine metabolism and subsequent cycling performance. *Journal of Caffeine and Adenosine Research*, 8 (2), 65–70. <https://doi.org/10.1089/caff.2017.0028>
- Glaister M. (2008) Multiple-sprint work: methodological, physiological, and experimental issues. *International Journal of Sports Physiology and Performance*, 3 (1), 107–112. <https://doi.org/10.1123/ijssp.3.1.107>
- Glaister M., Chopra K., Pereira De Sena A.L., Sternbach C., Morina L., Mavrommatis Y. (2021) Caffeine, exercise physiology, and time-trial performance: no effect of ADORA2A or CYP1A2 genotypes. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 46 (6), 541–551. <https://doi.org/10.1139/apnm-2020-0551>
- Glaister M., Williams B.H., Muniz-Pumares D., Balsalobre-Fernández C., Foley P. (2016) The effects of caffeine supplementation on physiological responses to submaximal exercise in endurance-trained men. *PLOS ONE*, 11 (8), e0161375. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161375>
- Gonzaga L.A., Vanderlei L.C.M., Gomes R.L., Valenti V.E. (2017) Caffeine affects autonomic control of heart rate and blood pressure recovery after aerobic exercise in young adults: a crossover study. *Scientific Reports*, 7 (1), 14091. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14540-4>
- Graham T.E., Helge J.W., MacLean D.A., Kiens B., Richter E.A. (2000) Caffeine ingestion does not alter carbohydrate or fat metabolism in human skeletal muscle during exercise. *The Journal of Physiology*, 529 (Pt 3), 837–847. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.00837.x>
- Graham T.E., Spriet L.L. (1995) Metabolic, catecholamine, and exercise performance responses to various doses of caffeine. *Journal of Applied Physiology*, 78 (3), 867–874. <https://doi.org/10.1152/jappl.1995.78.3.867>

- Grgic J. (2021) Effects of caffeine on resistance exercise: a review of recent research. *Sports Medicine* (Auckland, N.Z.), 51 (11), 2281–2298. <https://doi.org/10.1007/s40279-021-01521-x>
- Grgic J., Grgic I., Pickering C., Schoenfeld B.J., Bishop D.J., Pedisic Z. (2020) Wake up and smell the coffee: caffeine supplementation and exercise performance-an umbrella review of 21 published meta-analyses. *British Journal of Sports Medicine*, 54 (11), 681–688. <https://doi.org/10.1136/bjsports-2018-100278>
- Grgic J., Pickering C., Del Coso J., Schoenfeld B.J., Mikulic P. (2021) CYP1A2 genotype and acute ergogenic effects of caffeine intake on exercise performance: a systematic review. *European Journal of Nutrition*, 60 (3), 1181–1195. <https://doi.org/10.1007/s00394-020-02427-6>
- Grzegorzewski J., Bartsch F., Köller A., König M. (2022) Pharmacokinetics of caffeine: a systematic analysis of reported data for application in metabolic phenotyping and liver function testing. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 752826. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.752826>
- Guest N., Corey P., Vescovi J., El-Sohemy A. (2018) Caffeine, CYP1A2 genotype, and endurance performance in athletes. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 50 (8), 1570–1578. <https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000001596>
- Guest N., VanDusseldorp T.A., Nelson M.T., Grgic J., Schoenfeld B.J., Jenkins N.D.M., Arent S.M., Antonio J., Stout J.R., Trexler E.T., Smith-Ryan A.E., Goldstein E.R., Kalman D.S., Campbell B.I. (2021) International society of sports nutrition position stand: caffeine and exercise performance. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 18 (1), 1. <https://doi.org/10.1186/s12970-020-00383-4>
- Gunes A., Dahl M.-L. (2008) Variation in CYP1A2 activity and its clinical implications: influence of environmental factors and genetic polymorphisms. *Pharmacogenomics*, 9 (5), 625–637. <https://doi.org/10.2217/14622416.9.5.625>
- Gunes A., Ozbey G., Vural E.H., Uluoglu C., Scordo M.G., Zengil H., Dahl M.-L. (2009) Influence of genetic polymorphisms, smoking, gender and age on CYP1A2 activity in a Turkish population. *Pharmacogenomics*, 10 (5), 769–778. <https://doi.org/10.2217/pgs.09.22>
- Han X.M., Ou-Yang D.S., Lu P.X., Jiang C.H., Shu Y., Chen X.P., Tan Z.R., Zhou H.H. (2001) Plasma caffeine metabolite ratio (17X/137X) in vivo associated with G-2964A and C734A polymorphisms of human CYP1A2. *Pharmacogenetics*, 11 (5), 429–435. <https://doi.org/10.1097/00008571-200107000-00006>
- Henderson G.C., Horning M.A., Lehman S.L., Wolfel E.E., Bergman B.C., Brooks G.A. (2004) Pyruvate shuttling during rest and exercise before and after endurance training in men. *Journal of Applied Physiology* (Bethesda, Md.: 1985), 97 (1), 317–325. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01367.2003>
- Hetzler R.K., Knowlton R.G., Somani S.M., Brown D.D., Perkins R.M. (1990) Effect of paraxanthine on FFA mobilization after intravenous caffeine administration in humans. *Journal of Applied Physiology*, 68 (1), 44–47. <https://doi.org/10.1152/jappl.1990.68.1.44>
- Hogervorst E., Riedel W.J., Kovacs E., Brouns F., Jolles J. (1999) Caffeine improves cognitive performance after strenuous physical exercise. *International Journal of Sports Medicine*, 20 (6), 354–361. <https://doi.org/10.1055/s-2007-971144>
- Jacobson A.F., Cerqueira M.D., Raisys V., Shattuc S. (1994) Serum caffeine levels after 24 hours of caffeine abstention: observations on clinical patients undergoing myocardial perfusion imaging with dipyridamole or adenosine. *European Journal of Nuclear Medicine*, 21 (1), 23–26. <https://doi.org/10.1007/BF00182302>
- Kamimori G.H., Karyekar C.S., Otterstetter R., Cox D.S., Balkin T.J., Belenky G.L., Eddington N.D. (2002) The rate of absorption and relative bioavailability of caffeine admi-

- nistered in chewing gum versus capsules to normal healthy volunteers. *International Journal of Pharmaceutics*, 234 (1–2), 159–167. [https://doi.org/10.1016/s0378-5173\(01\)00958-9](https://doi.org/10.1016/s0378-5173(01)00958-9)
- Kapsis D.P., Tsoukos A., Psarraki M.P., Douda H.T., Smilios I., Bogdanis G.C. (2022) Changes in body composition and strength after 12 weeks of high-intensity functional training with two different loads in physically active men and women: a randomized controlled study. *Sports*, 10 (1), 1. <https://doi.org/10.3390/sports10010007>
- Kim H.-Y. (2013) Statistical notes for clinical researchers: assessing normal distribution (2) using skewness and kurtosis. *Restorative Dentistry & Endodontics*, 38 (1), 52–54. <https://doi.org/10.5395/rde.2013.38.1.52>
- Kluszczewicz B., Bechke E., Williamson C., Bailey P., Hoffstetter W., McLester J., McLester C. (2018) The influence of citrus aurantium and caffeine complex versus placebo on the cardiac autonomic response: a double blind crossover design. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 15 (1), 34. <https://doi.org/10.1186/s12970-018-0240-0>
- Kovacs E.M., Stegen J.H.C.H., Brouns F. (1998) Effect of caffeinated drinks on substrate metabolism, caffeine excretion, and performance. *Journal of Applied Physiology* (Bethesda, Md.: 1985), 85 (2), 709–715. <https://doi.org/10.1152/jappl.1998.85.2.709>
- Kyle U.G., Bosaeus I., De Lorenzo A.D., Deurenberg P., Elia M., Gómez J.M., Heitmann B.L., Kent-Smith L., Melchior J.C., Pirlich M., Scharfetter H., Schols A.M.W.J., Pichard C. (2004) Bioelectrical impedance analysis – part I: review of principles and methods. *Clinical Nutrition* (Edinburgh, Scotland), 23 (5), 1226–1243. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2004.06.004>
- Lajin B., Schweighofer N., Goessler W., Obermayer-Pietsch B. (2021) The determination of the paraxanthine/caffeine ratio as a metabolic biomarker for CYP1A2 activity in various human matrices by UHPLC-ESIMS/MS. *Talanta*, 234, 122658. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122658>
- Larrosa M., Gil-Izquierdo A., González-Rodríguez L.G., Alférez M.J.M., San Juan A.F., Sánchez-Gómez Á., Calvo-Ayuso N., Ramos-Álvarez J.J., Fernández-Lázaro D., Lopez-Grueso R., López-León I., Moreno-Lara J., Domínguez-Balmaseda D., Illescas-Quiroga R., Cuenca E., López T., Montoya J.J., Rodrigues-de-Souza D.P., Carrillo-Alvarez E., Casado A., Rodriguez-Doñate B., Porta-Oliva M., Santiago C., Iturriaga T., De Lucas B., Solaeasa Á.G., Montero-López M.D.P., Benítez De Gracia E., Veiga-Herreros P., Muñoz-López A., Orantes-Gonzalez E., Barbero-Alvarez J.C., Cabeza-Ruiz R., Carnero-Díaz Á., Sospedra I., Fernández-Galván L.M., Martínez-Sanz J.M., Martín-Almena F.J., Pérez M., Guerra-Hernández E.J., López-Samanes Á., Sánchez-Oliver A.J., Domínguez R. (2024) Nutritional strategies for optimizing health, sports performance, and recovery for female athletes and other physically active women: a systematic review. *Nutrition Reviews*, 83 (3), e1068–e1089. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuae082>
- Liguori A., Robinson J.H. (2001) Caffeine antagonism of alcohol-induced driving impairment. *Drug and Alcohol Dependence*, 63 (2), 123–129. [https://doi.org/10.1016/s0376-8716\(00\)00196-4](https://doi.org/10.1016/s0376-8716(00)00196-4)
- Lopes-Silva J.P., da Silva Santos J.F., Branco B.H.M., Abad C.C.C., de Oliveira L.F., Loturco I., Franchini E. (2015) Caffeine ingestion increases estimated glycolytic metabolism during taekwondo combat simulation but does not improve performance or parasympathetic reactivation. *PLOS ONE*, 10 (11), e0142078. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142078>
- Lorenzo Calvo J., Fei X., Domínguez R., Pareja-Galeano H. (2021) Caffeine and cognitive functions in sports: a systematic review and meta-analysis. *Nutrients*, 13 (3), 868. <https://doi.org/10.3390/nu13030868>

- Loy B.D., O'Connor P.J., Lindheimer J.B., Covert S.F. (2015) Caffeine is ergogenic for adenosine A2A receptor gene (ADORA2A) T allele homozygotes: a pilot study. *Journal of Caffeine Research*, 5 (2), 73–81. <https://doi.org/10.1089/jcr.2014.0035>
- Magkos F., Kavouras S.A. (2005) Caffeine use in sports, pharmacokinetics in man, and cellular mechanisms of action. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45 (7–8), 535–562. <https://doi.org/10.1080/1040-830491379245>
- Maughan R.J. (1982) A simple, rapid method for the determination of glucose, lactate, pyruvate, alanine, 3-hydroxybutyrate and acetoacetate on a single 20-mul blood sample. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 122 (2), 231–240. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(82\)90282-0](https://doi.org/10.1016/0009-8981(82)90282-0)
- van Melick N., Meddeler B.M., Hoozeboom T.J., Nijhuis-van der Sanden M.W.G., van Cingel R.E.H. (2017). How to determine leg dominance: the agreement between self-reported and observed performance in healthy adults. *PLOS ONE*, 12 (12), e0189876. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189876>
- Mesquita R.N.O., Cronin N.J., Kyröläinen H., Hintikka J., Avela J. (2020) Effects of caffeine on neuromuscular function in a non-fatigued state and during fatiguing exercise. *Experimental Physiology*, 105 (4), 690–706. <https://doi.org/10.1113/EP088265>
- Muñoz A., López-Samanes Á., Aguilar-Navarro M., Varillas-Delgado D., Rivilla-García J., Moreno-Pérez V., Del Coso J. (2020) Effects of CYP1A2 and ADORA2A genotypes on the ergogenic response to caffeine in professional handball players. *Genes*, 11 (8), 8. <https://doi.org/10.3390/genes11080933>
- Nehlig A. (2018) Interindividual differences in caffeine metabolism and factors driving caffeine consumption. *Pharmacological Reviews*, 70 (2), 384–411. <https://doi.org/10.1124/pr.117.014407>
- Nieber K. (2017) The impact of coffee on health. *Planta Medica*, 83 (16), 1256–1263. <https://doi.org/10.1055/s-0043-115007>
- Nordmark A., Lundgren S., Cnattingius S., Rane A. (1999) Dietary caffeine as a probe agent for assessment of cytochrome P4501A2 activity in random urine samples. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 47 (4), 397–402. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2125.1999.00918.x>
- Nuotto E., Mattila M.J., Seppälä T., Konno K. (1982) Coffee and caffeine and alcohol effects on psychomotor function. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 31 (1), 68–76. <https://doi.org/10.1038/clpt.1982.11>
- Perera V., Gross A.S., McLachlan A.J. (2010) Caffeine and paraxanthine HPLC assay for CYP1A2 phenotype assessment using saliva and plasma. *Biomedical Chromatography*, 24 (10), 1136–1144. <https://doi.org/10.1002/bmc.1419>
- Perera V., Gross A.S., McLachlan A.J. (2012) Measurement of CYP1A2 activity: a focus on caffeine as a probe. *Current Drug Metabolism*, 13 (5), 667–678. <https://doi.org/10.2174/1389200211209050667>
- Perera V., Gross A.S., Xu H., McLachlan A.J. (2011) Pharmacokinetics of caffeine in plasma and saliva, and the influence of caffeine abstinence on CYP1A2 metrics. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 63 (9), 1161–1168. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2011.01326.x>
- Podgórski T., Nowak A., Adrian J. (2015) Changes in lactate, pyruvate and glucose levels in field hockey players under different training and match stimuli. *Trends in Sport Sciences*, 22 (3).
- Reddy V.S., Shiva S., Manikantan S., Ramakrishna S. (2024) Pharmacology of caffeine and its effects on the human body. *European Journal of Medicinal Chemistry Reports*, 10, 100138. <https://doi.org/10.1016/j.ejmcr.2024.100138>

- Robertson D., Frölich J.C., Carr R.K., Watson J.T., Hollifield J.W., Shand D.G., Oates J.A. (1978) Effects of caffeine on plasma renin activity, catecholamines and blood pressure. *The New England Journal of Medicine*, 298 (4), 181–186. <https://doi.org/10.1056/NEJM197801262980403>
- Russell M., Reynolds N.A., Crewther B.T., Cook C.J., Kilduff L.P. (2020) Physiological and performance effects of caffeine gum consumed during a simulated half-time by professional academy rugby union players. *Journal of Strength and Conditioning Research*, 34 (1), 145–151. <https://doi.org/10.1519/JSC.0000000000002185>
- Salinero J.J., Lara B., Ruiz-Vicente D., Areces F., Puente-Torres C., Gallo-Salazar C., Pascual T., Del Coso J. (2017) CYP1A2 genotype variations do not modify the benefits and drawbacks of caffeine during exercise: a pilot study. *Nutrients*, 9 (3), 3. <https://doi.org/10.3390/nu9030269>
- Sampaio-Jorge F., Morales A.P., Pereira R., Barth T., Ribeiro B.G. (2021) Caffeine increases performance and leads to a cardioprotective effect during intense exercise in cyclists. *Scientific Reports*, 11 (1), 24327. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03158-2>
- Saunders B., da Costa L.R., de Souza R.A.S., Barreto G., Marticorena F.M. (2023) Caffeine and sport. W: F. Toldrá (ed.), *Advances in Food and Nutrition Research*, 106. Academic Press, 95–107. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2023.03.002>
- Saville C.W.N., de Morree H.M., Dundon N.M., Marcora S.M., Klein C. (2018) Effects of caffeine on reaction time are mediated by attentional rather than motor processes. *Psychopharmacology*, 235 (3), 749–759. <https://doi.org/10.1007/s00213-017-4790-7>
- Scott N.R., Chakraborty J., Marks V. (1984) Determination of caffeine, theophylline and theobromine in serum and saliva using high-performance liquid chromatography. *Annals of Clinical Biochemistry*, 21 (Pt 2), 120–124. <https://doi.org/10.1177/000456328402100208>
- Share B., Sanders N., Kemp J. (2009) Caffeine and performance in clay target shooting. *Journal of Sports Sciences*, 27 (6), 661–666. <https://doi.org/10.1080/02640410902741068>
- Signorell A., Aho K., Alfons A., Anderegg N., Aragon T., Arachchige C. i in. (2024). DescTools: tools for descriptive statistics (version 0.99.58). <https://doi.org/10.32614/CRAN.package.DescTools>
- Simmonds M.J., Minahan C.L., Sabapathy S. (2010) Caffeine improves supramaximal cycling but not the rate of anaerobic energy release. *European Journal of Applied Physiology*, 109 (2), 287–295. <https://doi.org/10.1007/s00421-009-1351-8>
- Skinner T.L., Jenkins D.G., Folling J., Leveritt M.D., Coombes J.S., Taaffe D.R. (2013a) Influence of carbohydrate on serum caffeine concentrations following caffeine ingestion. *Journal of Science and Medicine in Sport*, 16 (4), 343–347. <https://doi.org/10.1016/j.jsams.2012.08.004>
- Skinner T.L., Jenkins D.G., Leveritt M.D., McGorm A., Bolam K.A., Coombes J.S., Taaffe D.R. (2014) Factors influencing serum caffeine concentrations following caffeine ingestion. *Journal of Science and Medicine in Sport*, 17 (5), 516–520. <https://doi.org/10.1016/j.jsams.2013.07.006>
- Skinner T.L., Jenkins D.G., Taaffe D.R., Leveritt M.D., Coombes J.S. (2013b) Coinciding exercise with peak serum caffeine does not improve cycling performance. *Journal of Science and Medicine in Sport*, 16 (1), 54–59. <https://doi.org/10.1016/j.jsams.2012.04.004>
- Smirmaul B.P.C., de Moraes A.C., Angius L., Marcora S.M. (2017) Effects of caffeine on neuromuscular fatigue and performance during high-intensity cycling exercise in moderate hypoxia. *European Journal of Applied Physiology*, 117 (1), 27–38. <https://doi.org/10.1007/s00421-016-3496-6>

- Southward K., Rutherford-Markwick K.J., Ali A. (2018) The effect of acute caffeine ingestion on endurance performance: a systematic review and meta-analysis. *Sports Medicine* (Auckland, N.Z.), 48 (8), 1913–1928. <https://doi.org/10.1007/s40279-018-0939-8>
- Spigset O., Hägg S., Söderström E., Dahlqvist R. (1999) The paraxanthine:caffeine ratio in serum or in saliva as a measure of CYP1A2 activity: when should the sample be obtained? *Pharmacogenetics*, 9 (3), 409–412.
- Spriet L.L. (2014) Exercise and sport performance with low doses of caffeine. *Sports Medicine* (Auckland, N.Z.), 44 (Suppl 2), 175–184. <https://doi.org/10.1007/s40279-014-0257-8>
- Stadheim H.K., Kvamme B., Olsen R., Drevon C.A., Ivy J.L., Jensen J. (2013) Caffeine increases performance in cross-country double-poling time trial exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 45 (11), 2175–2183. <https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e3182967948>
- Stein J.A., Ramirez M., Heinrich K.M. (2020) Acute caffeine supplementation does not improve performance in trained CrossFit® athletes. *Sports*. 8 (4), 54. <https://doi.org/10.3390/sports8040054>
- Swift C.G., Tiplady B. (1988) The effects of age on the response to caffeine. *Psychopharmacology*, 94 (1), 29–31. <https://doi.org/10.1007/BF00735876>
- Talanian J.L., Spriet L.L. (2016) Low and moderate doses of caffeine late in exercise improve performance in trained cyclists. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 41 (8), 850–855. <https://doi.org/10.1139/apnm-2016-0053>
- Tian D., Natesan S., White J.R., Paine M.F. (2019) Effects of common CYP1A2 genotypes and other key factors on intraindividual variation in the caffeine metabolic ratio: an exploratory analysis. *Clinical and Translational Science*, 12 (1), 39–46. <https://doi.org/10.1111/cts.12598>
- Urry E., Jetter A., Landolt H.-P. (2016) Assessment of CYP1A2 enzyme activity in relation to type-2 diabetes and habitual caffeine intake. *Nutrition & Metabolism*, 13 (1), 66. <https://doi.org/10.1186/s12986-016-0126-6>
- Wickham K.A., Spriet L.L. (2018) Administration of caffeine in alternate forms. *Sports Medicine* (Auckland, N.Z.), 48 (Suppl 1), 79. <https://doi.org/10.1007/s40279-017-0848-2>
- Womack C.J., Saunders M.J., Bechtel M.K., Bolton D.J., Martin M., Luden N.D., Dunham W., Hancock M. (2012) The influence of a CYP1A2 polymorphism on the ergogenic effects of caffeine. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 9 (1), 7. <https://doi.org/10.1186/1550-2783-9-7>
- Wong O., Marshall K., Sicova M., Guest N., García-Bailo B., El-Sohemy A. (2021) CYP1A2 genotype modifies the effects of caffeine compared with placebo on muscle strength in competitive male athletes. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, 31 (5), 420–426. <https://doi.org/10.1123/ijsnem.2020-0395>
- Zawieja E., Chmurzynska A., Anioła J., Zawieja B., Cholewa J. (2023) The effect of caffeine supplementation on resistance and jumping exercise: the interaction with CYP1A2 and ADORA2A genotypes. *Nutraceuticals*, 3 (2), 2. <https://doi.org/10.3390/nutraceuticals3020022>
- Ziyaiyan A., Shabkhiz F., Hofmeister M. (2023) Supplementation of caffeine and sodium bicarbonate together could not improve performance and performance-related factors in CrossFit participants: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 20 (1), 2206390. <https://doi.org/10.1080/15502783.2023.2206390>

PODZIĘKOWANIA

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania Promotorowi, prof. AWF drowi hab. inż. Krzysztofowi Durkalec-Michalskiemu, za nieocenione wsparcie, merytoryczne wskazówki oraz nieustanną motywację podczas całego procesu przygotowywania dysertacji doktorskiej. Dziękuję za cierpliwość, zrozumienie oraz otwartość na moje pomysły, które pozwoliły mi rozwijać się naukowo i podejmować coraz większe wyzwania badawcze. Wiedza, doświadczenie i profesjonalizm Promotora były dla mnie inspiracją na każdym etapie. Jestem szczególnie wdzięczna za stworzenie atmosfery współpracy, w której czułam się zachęcona do samodzielności w poszukiwaniu odpowiedzi na pytania badawcze, a jednocześnie mogłam liczyć na wsparcie i wskazówki. Zaangażowanie Promotora i poświęcony czas pozostaną dla mnie nieocenioną wartością.

Pragnę serdecznie podziękować drowi Tomaszowi Podgórskiemu – za niezwykłą pomoc, wsparcie i zaangażowanie w trakcie realizacji mojego projektu. Jego wiedza, cierpliwość i gotowość do poświęcenia swojego czasu – nawet po godzinach pracy – były dla mnie nieocenionym wsparciem. To dzięki jego nieustającej chęci do dzielenia się doświadczeniem i wspólnej pracy w laboratorium udało mi się osiągnąć kluczowe etapy moich badań. Twoja pasja do nauki była nie tylko pomocą, ale również inspiracją, która motywowała mnie do dalszego działania. Jestem głęboko wdzięczna za każdą wspólnie przepracowaną godzinę, za cenne rady i za to, że mogłam liczyć na Ciebie zarówno w trudnych momentach, jak i w chwilach sukcesu. Dziękuję za to, że nie tylko pomogłeś mi rozwijać naukowe umiejętności, ale także okazałeś ludzkie wsparcie, które miało ogromne znaczenie podczas tej wymagającej drogi.

Ogromnie dziękuję rodzicom, którzy przez całe życie stawiali przede mną wysokie wymagania, kształtując moje podejście do nauki i pracy. Ich konsekwencja, wsparcie i zachęty do rozwoju sprawiły, że zawsze dążyłam do doskonałości. Dziękuję Wam za to, że nauczyliście mnie samodzielności, determinacji i wiary w to, że ciężką pracą można osiągnąć nawet najbardziej ambitne cele. Dziękuję także mojej młodszej siostrze, która swoją obecnością i wsparciem sprawiła, że niejednokrotnie patrzyłam na świat z innej perspektywy.

Z głębi serca pragnę podziękować moim przyjaciołom za ich wyrozumiałość, cierpliwość i wsparcie, które były dla mnie bezcenne podczas tej wymagającej drogi. Dziękuję, że pomimo mojego braku czasu, przeprowadzki do innego miasta i nieobecności podczas wielu ważnych chwil wciąż byliście przy mnie, wierząc we mnie i dopingując mnie. Wasza obecność, choć często na odległość, była dla mnie niezmiernie ważna i przypominała mi, że zawsze mogę na Was liczyć. Dziękuję za zrozumienie w momentach, gdy naukowe obowiązki pochłaniały mnie bez reszty, i za wszystkie rozmowy, które dawały mi siłę, inspirację i chwilę wytchnienia od codziennych wyzwań. Szczególnie dziękuję Ewelinie – za dzielenie ze mną trudów i radości podczas pracy nad doktoratem, za motywację w najtrudniejszych momentach oraz za to, że zawsze mogłam na Ciebie liczyć.

Pragnę z całego serca podziękować Jakubowi – za wsparcie, cierpliwość i miłość, które towarzyszyły mi przez cały czas pracy nad tym projektem doktorskim. Nasze drogi skrzyżowały się w wyjątkowym momencie mojego życia, a Twoja obecność dodała mi siły i wiary, że mogę pokonać wszelkie trudności. Dziękuję, że byłeś obok w chwilach zwątpienia i zmęczenia, za motywację, którą dawałeś mi każdego dnia. Twoje wsparcie, zrozumienie i niezachwiana wiara we mnie są bezcenne.

PRZEBIEG PRACY NAUKOWO-ZAWODOWEJ – INFORMACJE DODATKOWE

Publikacje naukowe (spoza cyklu)

Durkalec-Michalski K., Głowska N., Podgórski T., Woźniewicz M., Nowaczyk P.M. (2024) The effect of 12-week high-dose *Colostrum Bovinum* supplementation on immunological, hematological and biochemical markers in endurance athletes: a randomized crossover placebo-controlled study. *Frontiers in Immunology*, 15, 1425785. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1425785>

punktacja MNiSW: 140; Impact Factor: 5,7

Malik J., Głowska N., Jelonek W., Maciaszek J. (2024) The effect of juggling on the proprioceptive and attentional abilities among older women. *Frontiers in Public Health*, 12, 1386981. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2024.1386981>

punktacja MNiSW: 100; Impact Factor: 3,0

Durkalec-Michalski K., Głowska N., Podgórski T., Szymocha M., Przybylik B., Wochna K., Woźniewicz M., Nowaczyk P.M. (2024) Does *Colostrum Bovinum* supplementation affect swimming performance in endurance-trained males? A randomized placebo-controlled crossover study. *Nutrients*, 16 (18), 3204. <https://doi.org/10.3390/nu16183204>

punktacja MNiSW: 140; Impact Factor: 4,8

Durkalec-Michalski K., Głowska N., Podgórski T., Odrobny W., Krawczyński M., Botwina R., Bodzicz S., Nowaczyk P.M. (2024) Bovine colostrum supplementation as a new perspective in depression and substance use disorder treatment: a randomized placebo-controlled study. *Frontiers in Psychiatry* 15, 1366942. <https://doi.org/10.3389/fpsyt.2024.1366942>

punktacja MNiSW: 100; Impact Factor: 3,2

Malik J., Głowska N., Jelonek W., Stemplewski R., Maciaszek J. (2024) Effect of a juggling-based physical activity on postural stability, reaction time, and attention focus in older adults: a randomized crossover study. *European Review of Aging and Physical Activity*, 21 (1), 15. <https://doi.org/10.1186/s11556-024-00351-w>

punktacja MNiSW: 140; Impact Factor: 3,7

Zawieja E., Durkalec-Michalski K., Sadowski M., Głowska N., Chmurzynska A. (2023) Betaine supplementation improves CrossFit performance and increases testosterone levels, but has no influence on Wingate power: randomized crossover trial. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 20 (1), 2231411. <https://doi.org/10.1080/15502783.2023.2231411>

punktacja MEiN: 100; Impact Factor: 4,5

Durkalec-Michalski K., Głowska N., Nowaczyk P.M., Laszczak A., Gogojewicz A., Suliburska J. (2022) Do triathletes periodize their diet and do their mineral content, body composition and aerobic capacity change during training and competition periods? *Nutrients*, 15 (1), 6. <https://doi.org/10.3390/nu15010006>

punktacja MEiN: 140; Impact Factor: 4,8

Durkalec-Michalski K., Domagalski A., Głowska N., Kamińska J., Szymczak D., Podgórski T. (2022) Effect of a four-week vegan diet on performance, training efficiency and blood biochemical indices in Crossfit-trained participants. *Nutrients*, 14 (4), 894. <https://doi.org/10.3390/nu14040894>

punktacja MEiN: 140; Impact Factor: 5,9

Durkalec-Michalski K., Kusy K., Głowska N., Zieliński J. (2021) The effect of multi-ingredient intra- versus extra-cellular buffering supplementation combined with branched-chain amino acids and creatine on exercise-induced ammonia blood concentration and aerobic capacity in taekwondo athletes. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 18 (1), 48. <https://doi.org/10.1186/s12970-021-00451-3>

punktacja MEiN: 100; Impact Factor: 4,948

Durkalec-Michalski K., Nowaczyk P.M., Głowska N., Ziobrowska A., Podgórski T. (2021) Is a four-week ketogenic diet an effective nutritional strategy in Crossfit-trained female and male athletes? *Nutrients*, 13 (3), 864. <https://doi.org/10.3390/nu13030864>

punktacja MEiN: 140; Impact Factor: 6,706

Głowska N., Durkalec-Michalski K., Woźniewicz M. (2020) Immunological outcomes of Bovine Colostrum supplementation in trained and physically active people: a systematic review and meta-analysis. *Nutrients*, 12 (4), 1023. <https://doi.org/10.3390/nu12041023>

punktacja MNiSW: 140; Impact Factor: 5,719

Durkalec-Michalski K., Nowaczyk P.M., Głowska N., Grygiel A. (2019) Dose-dependent effect of caffeine supplementation on judo-specific performance and training activity: a randomized placebo-controlled crossover trial. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 16 (1), 38. <https://doi.org/10.1186/s12970-019-0305-8>

punktacja MNiSW: 100; Impact Factor: 5,068

Durkalec-Michalski K., Głowska N., Nowaczyk P., Mendowska K., Grygiel A. (2019) Ocena wpływu suplementacji kofeiną na specyficzne zdolności wysiłkowe u zawodników judo – badanie pilotażowe. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, LII, 2, 108–113.

Głowska N., Woźniewicz M. (2019) Potential use of Colostrum Bovinum supplementation in athletes – A review (2019) *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 18, 2, 115–123.

punktacja MNiSW: 40

Głowska N., Zegan M., Michota-Katulska E. (2018) Spożycie wybranych składników pokarmowych w aspekcie występowania potencjalnych konsekwencji zdrowotnych u pływaków. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, LI, 1, 39–46.

Bibliometryczne podsumowanie osiągnięć

Index H (według JCR): 5

Liczba cytowań (według JCR): 114 (107 bez autocytowań)

Sumaryczny Impact Factor: 66,441

Łącznie punktacja MNiSW/MEiN: 1720

Staże naukowe

Miesięczny staż naukowy pod opieką prof. Any Marii Teixeiry z Wydziału Nauk o Sporcie i Wychowania Fizycznego na Uniwersytecie w Coimbrze w Portugalii w ramach programu

PROM Narodowej Agencji Wymiany Akademickiej (1–30.11.2022 r.). Głównym jego celem było podniesienia kwalifikacji naukowych i praktycznych w obszarach obejmujących aspekty żywieniowego wspomagania potencjału immunologicznego, biochemicznego i wydolnościowego u sportowców.

Udział w realizacji projektów badawczych

1) w charakterze kierownika:

- projekt finansowany przez Narodowe Centrum Nauki, grant Preludium 22 pt. *Wpływ krótkoterminowej suplementacji wieloszczepowym probiotykiem na związane z wysiłkiem zaburzenia żołądkowo-jelitowe u wytrenowanych kobiet w kontrolowanych warunkach podczas profesjonalnego cyklu treningowego* (nr 2023/49/N/NZ7/02044, miejsce: Zakład Dietetyki Sportowej AWF Poznań);
- projekt w ramach programu rozwoju młodych pracowników nauki 2023 AWF Poznań pt. *Opracowanie metod efektywnej przedstartowej regulacji masy ciała oraz szybkiej odnowy żywieniowej, z wykorzystaniem diety ketogenicznej i wegańskiej, w dyscyplinach, w których obowiązują kategorie wagowe* (miejsce: Zakład Dietetyki Sportowej AWF Poznań);
- projekt w ramach programu rozwoju młodych pracowników nauki 2022 AWF Poznań pt. *Ocena wpływu podaży różnych dawek kofeiny na czas reakcji, wydolność fizyczną i specyficzne zdolności wysiłkowe zawodników uprawiających dyscypliny szybkościowo-siłowe* (miejsce: Zakład Dietetyki Sportowej AWF Poznań);

2) w charakterze wykonawcy:

- projekt finansowany przez Narodowe Centrum Nauki, grant Sonata 14 pt. *Ocena wpływu bodźców wysiłkowych/stresowych na mechanizmy i skuteczność działania kwasu beta-hydroksy-beta-metylomastłowego (HMB) u osób wytrenowanych i niedożywionych* (nr 2018/31/D/NZ7/00803, kierownik: prof. AWF dr hab. inż. K. Durkalec-Michalski, miejsce: Zakład Dietetyki Sportowej AWF Poznań);
- projekt finansowany przez Fundację Nutricia pt. *The effect of Colostrum Bovinum supplementation on upper respiratory tract infections rate and selected immunological biomarkers in trained athletes: a randomized, crossover, placebo-controlled, double-blind trial* (nr 3/2019, kierownik: prof. AWF dr hab. inż. K. Durkalec-Michalski, miejsce: Zakład Dietetyki Sportowej AWF Poznań);
- projekt w ramach programu rozwoju młodych pracowników nauki 2023 AWF Poznań pt. *Ocena synergistycznego wpływu suplementacji β -alaniny i wodorowęglanu sodu na wybrane wskaźniki wydolności fizycznej i stężenie markerów biochemicznych we krwi u wytrenowanych koszykarek* (kierownik: mgr J. Adamczewski, miejsce: Zakład Dietetyki Sportowej AWF Poznań);
- projekt w ramach programu rozwoju młodych pracowników nauki 2022 AWF Poznań pt. *Wpływ treningu kuglarskiego oraz żonglerki na wybrane funkcje poznawcze i zdolności koordynacyjne u osób starszych* (kierownik: mgr J. Malik, miejsce: Zakład Nauk o Aktywności Fizycznej i Promocji Zdrowia AWF Poznań).

Aktywne uczestnictwo w konferencjach naukowych

Durkalec-Michalski K., Głowska N., Podgórski T., Woźniewicz M., Malik J., Wochna K., Nowaczyk P.M., *Does bovine colostrum supplementation affect inflammatory and immunological outcomes in endurance athletes?*, 29th Annual Congress of the European College of Sport Science, Glasgow (Szkocja), 2–5.07.2024 r. (wystąpienie ustne).

Główka N., Malik J., Podgórski T., Nowaczyk P.M., Woźniewicz M., Durkalec-Michalski K., *The effect of Colostrum Bovinum supplementation on selected adaptation and nutritional status indices in trained athletes*, konferencja „Free radicals in biology, medicine, sport and nutrition”, Gdańsk, 20–21.10.2023 r. (sesja posterowa).

Durkalec-Michalski K., Główka N., Podgórski T., Woźniewicz M., Malik J., Wochna K., Nowaczyk P.M., *The effect of bovine colostrum supplementation on resting and exercise-induced changes in haematological blood parameters, physical capacity and performance in trained triathletes and swimmers*, 12th European Federation of Sports Medicine Associations Congress of Sports Medicine „Sporty Life – Healthy Life”, Wrocław, 19–20.10.2023 r. (wystąpienie ustne).

Durkalec-Michalski K., Główka N., Podgórski T., Woźniewicz M., Malik J., Wochna K., Nowaczyk P.M., *The effect of bovine colostrum supplementation on swimming performance in trained athletes*, Centro de Investigação em Desporto, Saúde e Desenvolvimento Humano International Congress 2023, Vila Real (Portugalia), 12–13.10.2023 r. (wystąpienie ustne).

Nowaczyk P., Główka N., Banasiak K., Kuncewicz G., Durkalec-Michalski K., *The impact of vegan weight loss diet and short-term nutritional recovery on exercise metabolism in combat sports athletes: a pilot study in females*, konferencja dydaktyczno-szkoleniowa „Żywność i żywienie osób aktywnych fizycznie. Profilaktyka, wspomaganie, bezpieczeństwo”, AWF Poznań, 9.05.2023 r. (wystąpienie ustne).

Główka N., Nowaczyk P., Podgórski T., Durkalec-Michalski K., *Ocena wpływu podaży różnych dawek kofeiny na specyficzne zdolności wysiłkowe sportowców uprawiających Cross-Fit – badanie pilotażowe*, XXXIV Międzynarodowy Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Medycyny Sportowej „Od zdrowia do wyczynu”, Szczecin, 15–17.09.2022 r. (wystąpienie ustne).

Główka N., *Ocena wpływu 4-tygodniowej diety wegańskiej na zdolności wysiłkowe oraz wybrane wskaźniki biochemiczne u osób trenujących CrossFit*, międzynarodowa konferencja naukowa II Kongres Młodej Nauki, Gdańsk, 7–10.07.2022 r. (wystąpienie ustne).

Główka N., *Nutritional support in the Covid-19 and URTI*, Autumn Open Scientific Seminar of the Department of Sports Dietetics, AWF Poznań, 25.11.2021 r. (wystąpienie ustne).

Główka N., Durkalec-Michalski K., Woźniewicz M., *The effect of Bovine Colostrum supplementation on SIgA concentration in trained and physically active people: a systematic review and meta-analysis*, 7th Lublin International Medical Congress, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, 26–28.11.2020 r. (wystąpienie ustne).

Główka N., *Wybrane możliwości wspomagania żywieniowo-suplementacyjnego w profilaktyce i leczeniu COVID-19*, konferencja „Uniwersytet w czasach pandemii: nauka, dydaktyka, administracja”, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, 24.09.2020 r. (wystąpienie ustne).

Durkalec-Michalski K., Główka N., Nowaczyk P., Mendowska K., Grygiel A., *Ocena wpływu suplementacji kofeiną na specyficzne zdolności wysiłkowe u zawodników judo – badanie pilotażowe*, XXVII Ogólnopolskie Sympozjum Bromatologiczne „Żywność i żywienie w profilaktyce chorób dietozależnych”, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu, 27–28.06.2019 r. (wystąpienie ustne).

Durkalec-Michalski K., Głowska N., Nowaczyk P., Mendowska K., Grygiel A., *Ocena wpływu przedwysiłkowej suplementacji kofeiną w wybranej grupie zawodników judo – badanie pilotażowe*, IX Ogólnopolska Konferencja Dietetyki „Congressus Dietetica”, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, 5–6.04.2019 r. (wystąpienie ustne).

Głowska N., Zegan M., *Sposób żywienia wybranej grupy pływaków*, I Poznański Kongres Naukowy Dietetyki, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, 2018 r. (sesja posterowa).

Głowska N., *Strategia żywieniowa w skokach do wody*, VII Ogólnopolska Konferencja Szkoleniowa Trenerów Pływania, Polski Związek Pływacki, Kraków 2016 r. (wystąpienie ustne).

Głowska N., *Interwencja żywieniowa w rehabilitacji*, III Forum Dyskusyjne Joint Preservation, Warszawa 2016 r. (wystąpienie ustne).

Głowska N., *Sposób żywienia piłkarzy*, II Ogólnopolska Konferencja Medycznych Studentów Kół Naukowych, Rzeszów, 2013 r. (wystąpienie ustne).

Nagrody

Nagroda dla młodych pracowników AWF Poznań za osiągnięcia badawcze „Ciągłe naprzód”, 16.11.2024 r.

Trzecie miejsce w sesji doktoranckiej za wystąpienie ustne pt. *The effect of Bovine Colostrum supplementation on SIgA concentration in trained and physically active people: a systematic review and meta-analysis*; 7th Lublin International Medical Congress, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, 26–28.11.2020 r.

Wyróżnienie za wystąpienie ustne pt. *Ocena wpływu suplementacji kofeiną na specyficzne zdolności wysiłkowe u zawodników judo – badanie pilotażowe*; XXVII Ogólnopolskie Sympozjum Bromatologiczne „Żywność i żywienie w profilaktyce chorób dietozależnych”, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu, 27–28.06.2019.

Recenzje manuskryptów w tematyce żywienia i suplementacji w sporcie w czasopismach indeksowanych przez Journal Citation Reports

Liczba zrecenzowanych manuskryptów: ponad 15, w czasopismach: BMC Microbiology, BMC Research Notes, BMC Sports Science, Medicine and Rehabilitation, Current Nutrition Reports, Frontiers in Nutrition, Journal of International Society of Sports Nutrition, Nutrition & Metabolism, Nutrition Journal, Nutrients, Scientific Reports, Sport Sciences for Health.

Dodatkowa działalność środowiskowa

Prowadzenie webinaru *Możliwości wykorzystania immunożywienia w sporcie i aktywności fizycznej* w ramach cyklu webinarów „Nauka z kulturą (fizyczną)” pod patronatem dyrektora Szkoły Doktorskiej prof. AWF dra hab. K. Kusego, AWF Poznań, 12.01.2023 r.

Aktywna członkini zespołu ds. popularyzacji nauki Krajowej Reprezentacji Doktorantów; od kwietnia 2021 r. (m.in. projekt pt. *Popularyzacja nie boli*).

ZAŁĄCZNIK 1. OŚWIADCZENIA

mgr Natalia Głowska
Imię i nazwisko doktorantki

Poznań, 18.11.2024
Miejscowość, data

Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej o jej oryginalności, samodzielności jej przygotowania i o nienaruszeniu praw autorskich

Ja, niżej podpisana oświadczam, że:

- a) rozprawa doktorska pt. *Efekt podaży różnych dawek kofeiny na zdolności wysiłkowe oraz stężenie kofeiny i paraksantyny we krwi i ślinie u osób trenujących CrossFit* jest wynikiem mojej działalności twórczej i powstała bez niedozwolonego udziału osób trzecich;
- b) wszystkie wykorzystane przeze mnie materiały źródłowe i opracowania zostały w niej wymienione, a napisana przez mnie praca nie narusza praw autorskich osób trzecich;
- c) załączona wersja elektroniczna pracy jest tożsama z wydrukiem rozprawy;
- d) praca nie była wcześniej podstawą nadania stopnia innej osobie.

Mam świadomość, że złożenie nieprawdziwego oświadczenia skutkować będzie niedopuszczeniem do dalszych czynności postępowania w sprawie nadania stopnia doktora lub cofnięciem decyzji o nadaniu mi stopnia doktora oraz wszczęciem postępowania dyscyplinarnego/karnego.

.....*Natalia Głowska*.....
Podpis doktorantki

mgr Natalia Głowska
Imię i nazwisko doktorantki

Poznań, 18.11.2024
Miejscowość, data

Dotyczy: postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki o kulturze fizycznej w Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu.

Oświadczenie

Oświadczam, że mój wkład w powstanie przedłożonej rozprawy doktorskiej pt. *Efekt podaży różnych dawek kofeiny na zdolności wysiłkowe oraz stężenie kofeiny i paraksantyny we krwi i ślinie u osób trenujących CrossFit*

polegał na:

zaplanowaniu założeń projektu, przygotowaniu wniosku do Komisji Bioetycznej, zarejestrowaniu projektu w bazie ClinicalTrials.gov, uzyskaniu funduszy na przeprowadzenie projektu, pozyskaniu uczestników projektu, przeprowadzeniu całego projektu i zebraniu wszystkich danych (*Publikacja 1 i 2*: nadzorowanie poboru próbek materiału biologicznego, przygotowanie materiału biologicznego do genotypowania *CYP1A2* i *ADORA2A*; *Publikacja 1*: nadzorowanie i przeprowadzenie testu specyficznych zdolności wysiłkowych, pomiar masy i składu ciała, pomiar częstości skurczów serca, pomiar subiektywnego odczucia zmęczenia, pomiar stabilności posturalnej, pomiar czasu reakcji, przygotowanie materiału biologicznego do analiz oraz przeprowadzenie analiz stężenia mleczanu i pirogronianu we krwi włóściwkowej; *Publikacja 2*: przygotowanie materiału biologicznego do analiz stężenia kofeiny i paraksantyny w surowicy krwi i ślinie, analiza stosunku paraksantyna:kofeina w surowicy krwi i ślinie, analiza aktywności enzymatycznej *CYP1A2*), analizie i interpretacji wszystkich uzyskanych danych, analizie dostępnej literatury naukowej, przygotowaniu pierwszych i kolejnych draftów manuskryptów, przygotowaniu i sprawdzeniu ostatecznej wersji manuskryptów, wybraniu i submitowaniu manuskryptów do wybranych czasopism naukowych, przygotowaniu odpowiedzi do recenzentów w czasopismach naukowych.

.....*Natalia Głowska*.....
Podpis doktorantki

prof. AWF dr hab. inż. Krzysztof Durkalec-Michalski Poznań, dnia 18 listopada 2024 roku

Akademia Wychowania Fizycznego im. E. Piaseckiego w Poznaniu,
Zakład Dietetyki Sportowej, Katedra Dietetyki
Królowej Jadwigi 27/39, 61-871 Poznań
e-mail: durkalec-michalski@awf.poznan.pl

**Oświadczenie wskazujące zadania, jakie pełnił promotor rozprawy doktorskiej
mgr Natalii Głównki pt.: „Efekt podaży różnych dawek kofeiny na zdolności wysiłkowe
oraz stężenie kofeiny i paraksantyny we krwi i ślinie u osób trenujących CrossFit”**

Jako kandydat na promotora dysertacji doktorskiej mgr Natalii Głównki kierowałem wcześniej badaniami różnych protokołów suplementacji, w tym kofeiny, w różnych dyscyplinach sportu. Uzyskane wyniki stały się źródłem do opracowania i następnie zwięzłego sukcesem przeprowadzenia z Doktorantką projektu badań różnych dawek kofeiny w wysiłkach funkcjonalnych typu CrossFit.

Przez cały okres prac nad realizacją przyjętego projektu badawczego moim zadaniem było udzielanie Doktorantce niezbędnej pomocy merytorycznej i metodycznej, pomocy podczas organizacji i prowadzenia badań, wspieraniu i opieki nad Jej efektywnym rozwojem naukowym, wpieraniu w organizacji warsztatu badawczego, udzielaniu wskazówek metodycznych, opiniowaniu rocznych sprawozdań Doktorantki z przebiegu jej kształcenia i czuwania nad stanem zaawansowania rozprawy doktorskiej. Po przeprowadzeniu badań moje działania jako promotora były związane z uczestnictwem w całym procesie przygotowania i realizacji prac naukowych.

Jednocześnie, jako promotor pracy stwierdzam, że Doktorantka wykazała się wzorowym profesjonalizmem oraz umiejętnością starannego zaplanowania i realizacji wszystkich działań związanych z pracą dokorską. Sposób prowadzenia przez Nią badań do pracy doktorskiej, a także przedłożona dysertacja pozwala mi także z pełnym przekonaniem na wskazanie dużego zaangażowania badawczego Doktorantki, a także Jej solidnego warsztatu naukowego, poziomu merytorycznego oraz obszernej wiedzy w poruszonym zakresie tematycznym.

Kierownik
Zakładu Dietetyki Sportowej

prof. AWF dr hab. Krzysztof Durkalec-Michalski
.....
Podpis Promotora

mgr Jakub Malik
Imię i nazwisko

Poznań, 12.11.2024
Miejscowość, data

Dotyczy: postępowania w sprawie nadania mgr Natalii Główce stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki o kulturze fizycznej w Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu.

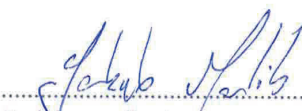
Oświadczenie

Oświadczam, że mój wkład w powstanie publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej pani mgr Natalii Główki zatytułowanej:

Efekt podaży różnych dawek kofeiny na zdolności wysiłkowe oraz stężenie kofeiny i paraksantyny we krwi i ślinie u osób trenujących CrossFit

polegał na:

przeprowadzeniu części projektu i zbieraniu części danych (Publikacja 1: pomiar stabilności posturalnej, pomiar czasu reakcji; Publikacja 2: analiza aktywności enzymatycznej CYP1A2), analizie i interpretacji wszystkich uzyskanych danych, przygotowaniu pierwszych draftów publikacji, analizie dostępnej literatury naukowej, sprawdzeniu ostatecznej wersji publikacji.


.....
Podpis współautora

dr Tomasz Podgórski
Imię i nazwisko

Poznań, 12.11.2024
Miejscowość, data

Dotyczy: postępowania w sprawie nadania mgr Natalii Główce stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki o kulturze fizycznej w Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu.

Oświadczenie

Oświadczam, że mój wkład w powstanie publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej pani mgr Natalii Główki zatytułowanej:

Efekt podaży różnych dawek kofeiny na zdolności wysiłkowe oraz stężenie kofeiny i paraksantyny we krwi i ślinie u osób trenujących CrossFit

polegał na:

przeprowadzeniu części projektu i zbieraniu części danych (Publikacja 1: przygotowanie materiału biologicznego do analiz oraz przeprowadzenie analiz stężenia mleczanu i pirogronianu we krwi włośniczkowej), sprawdzeniu ostatecznej wersji publikacji.


Podpis współautora

prof. AWF dr hab. Rafał Stemplewski
Imię i nazwisko

Poznań, 12.11.2024
Miejscowość, data

Dotyczy: postępowania w sprawie nadania mgr Natalii Główce stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki o kulturze fizycznej w Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu.

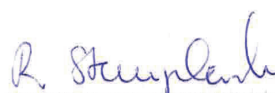
Oświadczenie

Oświadczam, że mój wkład w powstanie publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej pani mgr Natalii Główki zatytułowanej:

Efekt podaży różnych dawek kofeiny na zdolności wysiłkowe oraz stężenie kofeiny i paraksantyny we krwi i ślinie u osób trenujących CrossFit

polegał na:

przeprowadzeniu części projektu i zbieraniu części danych (*Publikacja 1: pomiar stabilności posturalnej, pomiar czasu reakcji*), analizie i interpretacji uzyskanych w pomiarze stabilności posturalnej i czasie reakcji danych, sprawdzeniu ostatecznej wersji publikacji.



Podpis współautora

prof. dr hab. Janusz Maciaszek
Imię i nazwisko

Poznań, 12.11.2024
Miejscowość, data

Dotyczy: postępowania w sprawie nadania mgr Natalii Główce stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki o kulturze fizycznej w Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu.

Oświadczenie

Oświadczam, że mój wkład w powstanie publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej pani mgr Natalii Główki zatytułowanej:

Efekt podaży różnych dawek kofeiny na zdolności wysiłkowe oraz stężenie kofeiny i paraksantyny we krwi i ślinie u osób trenujących CrossFit

polegał na:

przeprowadzeniu części projektu i zbieraniu części danych (*Publikacja 1*: pomiar stabilności posturalnej, pomiar czasu reakcji), sprawdzeniu ostatecznej wersji publikacji.


.....
Podpis współautora

dr Julia Ciążyńska
Imię i nazwisko

Poznań, 12.11.2024
Miejscowość, data

Dotyczy: postępowania w sprawie nadania mgr Natalii Główce stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki o kulturze fizycznej w Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu.

Oświadczenie

Oświadczam, że mój wkład w powstanie publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej pani mgr Natalii Główki zatytułowanej:

Efekt podaży różnych dawek kofeiny na zdolności wysiłkowe oraz stężenie kofeiny i paraksantyny we krwi i ślinie u osób trenujących CrossFit

polegał na:

przeprowadzeniu części projektu i zbieraniu części danych (*Publikacja 1*: pomiar stabilności posturalnej, pomiar czasu reakcji), sprawdzeniu ostatecznej wersji publikacji.


.....
Podpis współautorki

dr Emilia Zawieja
Imię i nazwisko

Poznań, 12.11.2024
Miejscowość, data

Dotyczy: postępowania w sprawie nadania mgr Natalii Główce stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki o kulturze fizycznej w Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu.

Oświadczenie

Oświadczam, że mój wkład w powstanie publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej pani mgr Natalii Główki zatytułowanej:

Efekt podaży różnych dawek kofeiny na zdolności wysiłkowe oraz stężenie kofeiny i paraksantyny we krwi i ślinie u osób trenujących CrossFit

polegał na: przeprowadzeniu części projektu i zbieraniu części danych (*Publikacja 1 i 2: przeprowadzenie analiz genotypowania CYP1A2 i ADORA2A*), sprawdzeniu ostatecznej wersji publikacji.

Emilia Zawieja
Podpis współautorki

prof. dr hab. Agata Chmurzyńska
Imię i nazwisko

Poznań, 12.11.2024
Miejscowość, data

Dotyczy: postępowania w sprawie nadania mgr Natalii Główce stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki o kulturze fizycznej w Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu.

Oświadczenie

Oświadczam, że mój wkład w powstanie publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej pani mgr Natalii Główki zatytułowanej:

Efekt podaży różnych dawek kofeiny na zdolności wysiłkowe oraz stężenie kofeiny i paraksantyny we krwi i ślinie u osób trenujących CrossFit

polegał na: przeprowadzeniu części projektu i zbieraniu części danych (*Publikacja 1 i 2: przeprowadzenie analiz genotypowania CYP1A2 i ADORA2A*), sprawdzeniu ostatecznej wersji publikacji.

KIEROWNIK KATEDRY
ŻYWIENIA CZŁOWIEKA I DIETETYKI
Agata Chmurzyńska
..... prof. dr hab. n. med. i n. o zdr.
Podpis współautorki

dr inż. Paulina Nowaczyk
Imię i nazwisko

Poznań, 12.11.2024
Miejscowość, data

Dotyczy: postępowania w sprawie nadania mgr Natalii Główce stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki o kulturze fizycznej w Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu.

Oświadczenie

Oświadczam, że mój wkład w powstanie publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej pani mgr Natalii Główki zatytułowanej:

Efekt podaży różnych dawek kofeiny na zdolności wysiłkowe oraz stężenie kofeiny i paraksantyny we krwi i ślinie u osób trenujących CrossFit

polegał na:

udziale w przygotowaniu wniosku do Komisji Bioetycznej, przeprowadzeniu części projektu i zbieraniu części danych (*Publikacja 1*: pomiar masy i składu ciała, przeprowadzenie testu specyficznych zdolności wysiłkowych, pomiar częstości skurczów serca, pomiar subiektywnego odczucia zmęczenia), sprawdzeniu ostatecznej wersji publikacji.


Podpis współautorki

prof. AWF dr hab. inż. Krzysztof Durkalec-Michalski
Imię i nazwisko

Poznań, 12.11.2024
Miejscowość, data

Dotyczy: postępowania w sprawie nadania mgr Natalii Główce stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki o kulturze fizycznej w Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu.

Oświadczenie

Oświadczam, że mój wkład w powstanie publikacji (*Publikacja 1 i 2*) wchodzących w skład rozprawy doktorskiej pani mgr Natalii Główki zatytułowanej:

Efekt podaży różnych dawek kofeiny na zdolności wysiłkowe oraz stężenie kofeiny i paraksantyny we krwi i ślinie u osób trenujących CrossFit

polegał na: udziale w konceptualizacji i planowaniu badań, przygotowaniu wniosku do Komisji Bioetycznej, udziale w badaniach i zbieraniu danych, przygotowaniu manuskryptów i nadzorowaniu jako promotor całego projektu doktorskiego na wszystkich jego etapach.

Kierownik
Zakładu Dietetyki Sportowej

prof. AWF dr hab. Krzysztof Durkalec-Michalski

.....
Podpis współautora

dr hab. inż. Jacek Anioła
Imię i nazwisko

Poznań, 12.11.2024
Miejscowość, data

Dotyczy: postępowania w sprawie nadania mgr Natalii Główce stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki o kulturze fizycznej w Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu.

Oświadczenie

Oświadczam, że mój wkład w powstanie publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej pani mgr Natalii Główki zatytułowanej:

Efekt podaży różnych dawek kofeiny na zdolności wysiłkowe oraz stężenie kofeiny i paraksantyny we krwi i ślinie u osób trenujących CrossFit

polegał na:

przeprowadzeniu części projektu i zbieraniu części danych (*Publikacja 2: przeprowadzenie analiz stężenia kofeiny i paraksantyny w surowicy krwi i ślinie*), sprawdzeniu ostatecznej wersji publikacji.

12 LIS. 2024


Podpis współautora

ZAŁĄCZNIK 2. PUBLIKACJE



Journal of the International Society of Sports Nutrition



ISSN: (Print) (Online) Journal homepage: www.tandfonline.com/journals/rssn20

The dose-dependent effect of caffeine supplementation on performance, reaction time and postural stability in CrossFit – a randomized placebo-controlled crossover trial

Natalia Głównka, Jakub Malik, Tomasz Podgórski, Rafał Stemplewski, Janusz Maciaszek, Julia Ciężyńska, Emilia E. Zawieja, Agata Chmurzynska, Paulina M. Nowaczyk & Krzysztof Durkalec-Michalski

To cite this article: Natalia Głównka, Jakub Malik, Tomasz Podgórski, Rafał Stemplewski, Janusz Maciaszek, Julia Ciężyńska, Emilia E. Zawieja, Agata Chmurzynska, Paulina M. Nowaczyk & Krzysztof Durkalec-Michalski (2024) The dose-dependent effect of caffeine supplementation on performance, reaction time and postural stability in CrossFit – a randomized placebo-controlled crossover trial, Journal of the International Society of Sports Nutrition, 21:1, 2301384, DOI: [10.1080/15502783.2023.2301384](https://doi.org/10.1080/15502783.2023.2301384)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/15502783.2023.2301384>



© 2024 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.



Published online: 16 Jan 2024.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 4707



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)



Citing articles: 4 View citing articles [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=rssn20>

The dose-dependent effect of caffeine supplementation on performance, reaction time and postural stability in CrossFit – a randomized placebo-controlled crossover trial

Natalia Głowska ^a, Jakub Malik ^b, Tomasz Podgórski ^c, Rafał Stemplewski ^d, Janusz Maciaszek ^b, Julia Ciężyńska ^b, Emilia E. Zawieja ^e, Agata Chmurzynska ^e, Paulina M. Nowaczyk ^a and Krzysztof Durkalec-Michalski ^{a,f}

^aDepartment of Sports Dietetics, Poznań University of Physical Education, Poznań, Poland; ^bDepartment of Physical Activity and Health Promotion Science, Poznań University of Physical Education, Poznań, Poland; ^cDepartment of Physiology and Biochemistry, Poznań University of Physical Education, Poznań, Poland; ^dDepartment of Digital Technologies in Physical Activity, Poznań University of Physical Education, Poznań, Poland; ^eDepartment of Human Nutrition and Dietetics, Poznań University of Life Sciences, Poznań, Poland; ^fSport Sciences–Biomedical Department, Faculty of Physical Education and Sport, Charles University, Prague, Czech Republic

ABSTRACT

Background: Caffeine (CAF) ingestion improves performance in a broad range of exercise tasks. Nevertheless, the CAF-induced, dose-dependent effect on discipline-specific performance and cognitive functions in CrossFit/High-Intensity Functional Training (HIFT) has not been sufficiently investigated. The aim of this study was to evaluate the effect of acute supplementation of three different doses of CAF and placebo (PLA) on specific performance, reaction time (R_{Time}), postural stability (P_{Stab}), heart rate (HR) and perceived exertion (RPE).

Methods: In a randomized double-blind placebo-controlled crossover design, acute pre-exercise supplementation with CAF (3, 6, or 9 mg/kg body mass (BM)) and PLA in 26 moderately trained CrossFit practitioners was examined. The study protocol involved five separate testing sessions using the Fight Gone Bad test (FGB) as the exercise performance evaluation and biochemical analyses, HR and RPE monitoring, as well as the assessment of R_{Time} and P_{Stab} with regard to *CYP1A2* (rs762551) and *ADORA2A* (rs5751876) single nucleotide polymorphism (SNP).

Results: Supplementation of 6 mg_{CAF}/kg_{BM} induced clinically noticeable improvements in FGB_{Total} results, R_{Time} and pre-exercise motor time. Nevertheless, there were no significant differences between any CAF doses and PLA in FGB_{Total}, HR_{max}, HR_{mean}, RPE, pre/post-exercise R_{Time} , P_{Stab} variables or pyruvate concentrations. Lactate concentration was higher ($p < 0.05$) before and after

ARTICLE HISTORY

Received 9 November 2023
Accepted 28 December 2023

KEYWORDS

cognitive function;
ergogenic support; high-intensity functional exercise;
sports dietetics; stability;
supplementation

CONTACT Krzysztof Durkalec-Michalski  durkalec-michalski@awf.poznan.pl  Department of Sports Dietetics, Poznań University of Physical Education, Królowej Jadwigi 27/39, Poznań 61-871, Poland; Natalia Głowska  glowka@awf.poznan.pl

© 2024 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. The terms on which this article has been published allow the posting of the Accepted Manuscript in a repository by the author(s) or with their consent.

exercise in all CAF doses than in PLA. There was no effect of CYP1A2 or ADORA2A SNPs on performance.

Conclusions: The dose-dependent effect of CAF supplementation appears to be limited to statistically nonsignificant but clinically considered changes on specific performance, R_{Time} , P_{Stab} , RPE or HR. However, regarding practical CAF-induced performance implications in CrossFit/HIFT, $6 \text{ mg}_{CAF}/\text{kg}_{BM}$ may be supposed as the most rational supplementation strategy.

1. Introduction

Caffeine (CAF) is a substance with a long history of performance-enhancing usage [1,2]. The latest umbrella review of 21 published meta-analyses on CAF supplementation and exercise performance [1] suggested that CAF ingestion improves muscle strength and endurance, anaerobic power or aerobic endurance. Although, most studies adapted standardly prescribed [2] single CAF portions ($3\text{--}6 \text{ mg}_{CAF}/\text{kg}$ body mass (BM)) taken 30–60 min before exercise, the optimal doses remain still elusive, which may differ based on several factors, like exercise specificity, habitual CAF consumption, training experience, or gender [1–3]. Bounding to the adenosine receptors in the central nervous system (CNS) is the main mechanism of CAF action. Moreover, other mechanisms, like increasing myofibrillar Ca^{2+} availability or optimizing exercise metabolism and energy substrate availability, have been proposed to be responsible for ergogenic effects of CAF [2,3].

In terms of the impact of CAF in sport, it is noteworthy that its potential may be linked to the specificity of the efforts performed [2]. In this respect, particular attention is drawn to CrossFit/High-Intensity Functional Training (HIFT), which incorporates functional, multi-modal movements, which are performed at high intensity and may improve general physical fitness [4,5]. It is suggested that CrossFit/HIFT training improves exercise performance, strength, aerobic and anaerobic capacity, power output, body composition, as well as resting heart rate (HR) or blood pressure [6]. There are several CrossFit/HIFT benchmark workouts (i.e. Grace, Fran, or Nancy) determining exercise performance [4,5]. One of them (Fight Gone Bad, FGB) has been validated and well-described recently, as a discipline-specific test measuring HIFT performance, by incorporating several crucial physiological traits, like stamina, strength, speed, endurance, and power [7]. Nevertheless, studies measuring the influence of dietary regimens or supplementation in CrossFit/HIFT used different exercise tests, making it difficult to compare the performance results.

Athlete's attention, being one of the cognitive functions, is defined as the allocation of cognitive resources to internal or external stimuli. CAF can lead to the release of neurotransmitters, like dopamine and noradrenaline [8], which may promote beneficial mood changes, reduced feeling of fatigue and increased alertness. These could be also beneficial for athletes at the cognitive level [8]. Positive effects of CAF have been reported in studies examining learning speed, delayed recall, accuracy, willingness of physical effort, and reaction time (R_{Time}) in response to the Stroop test and the Rapid Visual Information Processing test [9,10]. In turn, maintaining an upright stance is controlled via unconscious balance mechanisms, cortical structures and cognitive processes. CAF may influence sensorimotor functions, especially the control of standing. Muscular function and

cognition aspects, like perception and attention, enhanced after CAF ingestion may positively affect postural stability (P_{Stab}). On the other hand, balance may be impaired by CAF via postural disturbances caused by stimulating effects of ventilation [11].

Moreover, it is suggested that CAF ergogenicity may rely upon the genotype-modulated differences in the rate of its metabolism [3,12,13]. In this respect, it is indicated that the rs762551 single nucleotide polymorphism (SNP) of the *CYP1A2* gene can differentiate the enzyme activity into: “fast” (AA homozygotes), “slow” (AC heterozygotes) and “ultra-slow” (CC homozygotes) metabolizers [12]. In view of the fact that CAF metabolites have greater affinity to the adenosine receptors, it is suggested that faster demethylation into CAF metabolites occurs in AA homozygotes [13]. It may induce greater performance benefits by intensifying the response to CAF supplementation. In turn, it is suggested that “slow”/“ultra-slow” CAF metabolism, associated with extended periods of excessive blockage of adenosine receptors by CAF, can be detrimental to performance [3,12]. Furthermore, the other indicated gene suggested to be important in the modulation of response to CAF is *ADORA2A*, which rs5751876 SNP (three genotypes: TT and CC homozygotes, CT heterozygotes) may affect the sensitivity to CAF consumption, like the level of anxiety or emotional processing [3]. Individuals may be categorized as having a high (TT) or low (CC, CT) CAF sensitivity [14]. Nevertheless, the latest evidence do not support the hypothesis that this polymorphism in *ADORA2A* affects different performance effects [3].

Moreover, there is hardly any data on the individual dose-dependent CAF-induced changes in discipline-specific performance in CrossFit/HIFT. Therefore, the aim of our study was to evaluate the effect of three different doses of acute CAF supplementation (3, 6 and 9 mg_{CAF}/kg_{BM}) on specific performance, R_{Time} , P_{Stab} , HR and rating of perceived exertion (RPE), in a group of healthy, and moderately CrossFit/HIFT-trained athletes. Moreover, these associations may be modified by gene. For this reason, we also examined the interactions between CAF treatment dosage, FGB results and genotypes of two genes, which determine the effects of CAF on the body, namely *CYP1A2* (rs762551 A>C polymorphism) and *ADORA2A* (rs5751876 C>T polymorphism). We hypothesized that the ergogenic effects would be different and dose-dependent in all outcome measures, and that AA homozygotes would respond differently to AC heterozygotes/CC homozygotes (*CYP1A2*) and TT homozygotes differently to C-allele carriers (*ADORA2A*).

2. Materials and methods

2.1. Study design, protocol, and visits

The study protocol consisted of acute supplementation with three doses of CAF (3, 6, 9 mg_{CAF}/kg_{BM}) or PLA in a randomized double-blind placebo-controlled crossover design. The whole study protocol included five visits (T_0 – T_4) to the laboratory (Figure 1). After the familiarization to the study protocol, enrolled volunteers were subjected to the first visit (T_0 ; baseline (BASE), without supplementation treatment). After T_0 , the participants were randomly assigned (stratified randomization based on FGB test results) to the treatment order with specific codes by an impartial biostatistician. The main study protocol involving four separate visits (T_1 – T_4) included anthropometric and body composition measurements, discipline-specific performance tests (FGB), R_{Time} and P_{Stab} examinations and blood sampling. All testing was performed at the same time of the day for



the participant. A 7-day washout period was introduced between treatments, which was likely a sufficient period given the kinetics of CAF excretion from the body [15]. The participants consumed a standardized meal in compliance with our previous studies (Carbohydrates: 2 g/kg_{BM}, proteins: 25 g, water: 7 mL/kg_{BM} [16,17]) 3 h before the visits. They were also instructed to avoid CAF-containing products for the 24 h preceding each test session. Moreover, participants were divided post hoc into groups according to *CYP1A2* genotype (AA homozygotes and C-allele carriers) and *ADORA2A* genotype (C-allele carriers and TT homozygotes).

The primary outcome in our study was a change in CrossFit/HIFT-specific performance, R_{Time} , and P_{Stab} . In turn, HR, RPE, lactate and pyruvate concentrations, and SNPs in *CYP1A2* and *ADORA2A* genes were defined as secondary outcomes.

2.2. Participants

Twenty-seven moderately CrossFit/HIFT-trained participants were initially enrolled in this study. Finally, 26 of them (10 females, 16 males) completed the entire study protocol and were included in the analyses (Figure 1; Table 1). All moderately trained athletes were members of the CrossFit clubs from Poznań. The criteria for qualifying for the study included good health condition, a valid and up-to-date medical certificate confirming the athlete's ability to practice sports, at least 2 years of CrossFit/HIFT training experience, a minimum of 4 workout sessions a week, and a habitual moderate intake of CAF-containing products (participants ingested approximately 231 mg of CAF each day, which refers to more than two 240 mL cups of coffee) [18,19]. Both males and females were included because of the participation of both sexes in CrossFit/HIFT training. The study protocol was conducted in a few waves from July 2021 to December 2022 at the Department of Sports Dietetics (Poznań University of Physical Education, Poland). All athletes declared that they had not introduced any changes in their lifestyles, elements of training, nutrition or supplementation during the study protocol and that they were prepared for each study visit in the same manner, paying attention especially to the 24 h before the visit. This trial was reviewed and approved by the Bioethics Committee at Poznan University of Medical Sciences (reference number 293/17 of 11 May 2017) and was registered prospectively at ClinicalTrials.gov (NCT03822663). The study complies with the

Table 1. Baseline characteristics of the studied group ($n = 26$).

Variable	Mean $\pm$ SD
Age [years]	35.4 $\pm$ 6.5
Body mass [kg]	77.4 $\pm$ 16.6
Height [cm]	175 $\pm$ 9
Total Body Water [% , L]	57.2 $\pm$ 5.1, 44.1 $\pm$ 9.7
Fat Mass [% , kg]	19.9 $\pm$ 5.6, 15.5 $\pm$ 6.1
Fat-Free Mass [% , kg]	80.1 $\pm$ 5.7, 61.9 $\pm$ 13.6
Energy intake [kcal, kcal/kg _{BM}]	2362 $\pm$ 653, 31.0 $\pm$ 9.4
Carbohydrates intake [g, g/kg _{BM}]	281 $\pm$ 89, 3.1 $\pm$ 1.2
Protein intake [g, g/kg _{BM}]	125 $\pm$ 42, 1.6 $\pm$ 0.5
Fat intake [g, g/kg _{BM}]	84 $\pm$ 28, 1.1 $\pm$ 0.45

SD – standard deviation; BM – body mass.

CONSORT Statement for randomized trials as shown in [Figure 1](#). All study participants gave written informed consent. All procedures were carried out in accordance with the ethical standards of the Helsinki Declaration of 2013.

2.3. Procedures

2.3.1. Supplementation

In the experimental procedure, each athlete was supplemented with an acute dose of CAF (3- [LOW], 6- [MEDIUM] or 9 mg_{CAF}/kg_{BM} [HIGH]) and PLA treatment in a crossover regimen. CAF doses (pure pharmaceutical CAF, Ostrovit, Poland) and PLA (bitter aroma) were administered dissolved in 20 mL of orange juice and 80 mL of plain water, for masking the possibility of a bitter taste. On the testing days, the supplements were taken 70 min before the discipline-specific exercise test, immediately after the first blood sampling ([Figure 1](#)). The preparations were administered to each participant in containers marked with a unique code. In accordance with the recommended blinding procedure, the preparations were made in advance by the researcher who did not directly participate in the investigations. Regarding double blinding, neither the researchers nor the participants knew whether CAF or PLA was administered. Randomization details were anonymized and revealed after the protocol cessation. The preparations were administered at a strictly specified time before the exercise tests, and consumption compliance was controlled by the investigators.

2.3.2. Anthropometric and body composition measurements

Anthropometric measurements were taken at the beginning of each study visit to ensure the same conditions for the testing procedures. Prior to body composition analysis, BM and height were measured in duplicate using a calibrated scale with a stadiometer (WPT 60/150 OW, Radwag®, Radom, Poland). The total body water was assessed by bioelectric impedance with Bodystat 1500 (Bodystat Inc., Douglas, UK). Only properly hydrated participants were approved for testing. During the bioimpedance analyses, the recommended measurement conditions were strictly followed. The excellent repeatability and reliability of this method for body composition analysis were previously insightfully evaluated and are published elsewhere [7].

2.3.3. Nutritional assessment

During the familiarization visit, each participant filled the special questionnaire prepared for this study regarding the amount of usual CAF intake from natural products. Daily CAF intake was calculated based on databases by Nieber et al. [19]. Moreover, the use of CAF-containing supplements and the possible side effects after CAF intake were evaluated (by the questionnaire) to verify meeting the inclusion criteria. The assessment of the diets, with a special concern to the 24 h abstention to CAF-based products, was made on the basis of the open-ended dietary assessment method, where the participants self-recorded all the foods and beverages consumed, from the period of two consecutive days before each study visit. Participants were trained in the dietary recording method by a dietitian during the familiarization visit. The quantitative analysis of nutritional value of daily food rations was carried out using the dietary software, which utilizes a database developed by the National Food and Nutrition Institute in Warsaw (Kcalmar.pro software, Lublin, Poland).

2.3.4. Exercise test

2.3.4.1. Discipline-specific CrossFit/HIFT performance test. FGB test, being the cross-training benchmark workout test, was chosen to assess the performance of the participants, as a discipline-specific test to measure CrossFit/HIFT performance. The FGB workout was performed according to the protocol from our previous studies, and its repeatability was assessed as high [7,18,20]. Participants followed a 20 min of self-prepared warm-up right before the commencement of the test (the warm-up was always the same for each participant). The entire test lasted for 17 min ([3 rounds (R_{1-3}) $\times$ 5 min] and [2 breaks $\times$ 1 min between the rounds]). Each round consisted of five exercises: *Wall Ball Shots* (9 kg for males to a height of 3 m, 6 kg for females to a height of 2.75 m), *Sumo Deadlift High Pulls* (35 kg for males, 25 kg for females), *Box Jumps* (60 cm for males, 50 cm for females), *Push Presses* (35 kg for males, 25 kg for females), and *Rowing* (a damper setting of 7 for males and females). Participants were obligated to complete as many repetitions (or calories on rowing ergometer) as possible of each exercise during 1 min and immediately switch to the next exercise. For each valid repetition, a participant needed to complete the full range of motion required for a particular exercise. Test procedures were evaluated in real time by two independent investigators, and they were additionally visually registered. During exercise tests, the researchers and coaches provided verbal encouragement. Moreover, there was a constant monitoring of the HR using a telemetric system (Polar, Finland). From the collected data, HR_{mean} and HR_{max} were determined. At the end of the FGB, athletes were asked to rate their RPE using the Borg scale (6–20) according to published recommendations [18].

2.3.5. Reaction time test

The R_{Time} test was carried out twice during each study visit (1st – 65 min after supplementation, pre-exercise; 2nd – immediately after exercise) using the Vienna Test System (Viennese Test System by Schuhfried GmbH, Austria; Polish distribution – COGNIFIC). The Vienna Test System is a tool commonly used and recommended in the studies of cognitive functions in athletes [21]. This system allowed to determine the participant's R_{Time} with the accuracy of thousandths of a second. The test enabled a reliable assessment of the R_{Time} to the emerging stimulus; performing a specific reaction in the presence of various stimuli, including selection of these stimuli, while maintaining the effective R_{Time} . R_{Time} test was performed using a reaction panel – one of the reaction devices of the Vienna Test System with the resting and reaction key enabling splitting the variables into reaction (R_{Time}) and motor time (M_{Time}) in ms. The term R_{Time} referred to the time between the presentation of the stimulus and the occurrence of the response, which meant raising the finger from the resting button. In turn, M_{Time} referred to the time between raising a finger from the rest button and pressing the R_{Time} button. Moreover, variability of R_{Time} and M_{Time} was analyzed, which refers to inconsistency in an individual's time of responding. Participants reacted as quickly as possible to optical signals. The S1 test form the task chosen for the study from a battery of R_{Time} Vienna System tests concerned only one stimulus, lasted 4 min and included pressing the button when presented with a simple yellow light signal. The participant was instructed to use only one finger of the dominant hand. To standardize the measurements, each approach was preceded by a practice test, after which the participant performed a 4 min main test.

2.3.6. Postural stability test

The P_{Stab} was assessed four times (1st – 35 min after supplementation, before warm-up; 2nd – 65 min after supplementation, pre-exercise; 3rd – immediately after exercise; 4th – 10 min after the FGB test) during each study visit on a AccuGait™ posturography platform (AMTI PJB-101 model, AMTI, Watertown, MA, USA) with Balance Trainer software and sampling frequency 100 Hz. The platform allowed to monitor changes in ground reaction forces and, on this basis, assess the position and oscillation of the center of pressure of the feet (COP). The platform was placed on a flat, hard surface. Participants were barefoot for the measurements. Each time before the start of the test, participants were instructed with the same command: *“Please stand freely on the platform – one leg, with your arms along your torso, eyes open, gaze straight ahead”* [22]. The participants stood on the dominant leg, which was previously determined by asking: *“If you were shooting a ball at a target, which leg would you use to kick it?”* The answer to this question indicated leg dominance in the mobilization task, as well as in stabilization tasks in 66.7% of males and 85.0% of females [23]. Each test lasted for 30 s. COP velocity (V_{cop}) and area 95 percentile (Area95) were analyzed as the indicators of the P_{Stab} .

2.3.7. Blood collection and sample analysis

Fingertip capillary blood samples were obtained at four time-points (1st – pre-supplementation; 2nd – 30 min after supplementation; 3rd – 60 min after supplementation, pre-exercise; 4th – 3 min after exercise) during each study visit. Blood samples (50 μL) were taken and immediately transferred to microtubes containing 250 μL of 0.6 M perchloric acid. Lactate (La) and pyruvate (Pa) measurements were performed according to the method used in our previous study [20].

2.3.8. CYP1A2 and ADORA2A genotyping

Buccal swabs for CYP1A2 (rs762551) and ADORA2A (rs5751876) genotyping were collected on the first study visit. The participants were instructed to insert the swab into the mouth and rub firmly against the inside of the cheek or underneath lower and upper lip. Rubbing lasted for 1 min. DNA was isolated from exfoliated buccal epithelial cells using a standard kit (EXTRACTME® Genomic DNA Kit EM13, Blirt SA, Poland). Genotyping was performed as described previously [24], using commercially available TaqMan®SNP genotyping assays (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA, ID C___8881221_40 and C___2446672_50) on a LightCycler 480 instrument (Roche Diagnostics, Switzerland).

2.4. Statistical analysis

G*Power software (version 3.1.9.6, Germany) was used to calculate minimum sample size to obtain a power greater than 0.8 with an assumed probability of alpha error of 0.05. For the purposes of this research design, minimum sample size estimation by F-test – ANOVA RM within factors was used. A *medium* effect size (ES): $f(U) = 0.38$ was estimated based on data from umbrella review [1] (concerning data on aerobic and muscle endurance). Using this ES, one number of groups, five measurement points, nonsphericity correction ϵ equal to one, and “as in SPSS” option analysis indicated that a sample size of 23 participants would be adequate to minimize Type I and Type II errors. For Friedman’s ANOVA, the sample size was 26, assuming the

need for a 15% larger sample. The analysis was performed in Statistica 13.3 (TIBCO Software Inc. 2017) and RStudio using the DescTools package (Posit Software, PBC 2009–2023). The normality of the distribution of the variables was tested by comparing the values of skewness and kurtosis with the standard errors of these values (a value of skewness or kurtosis exceeding 1.96 standard error for a sample of less than 50 participants is considered not to meet the normality condition) [25]. Comparisons between means were made using ANOVA with repeated measures (when normality condition was met) or Friedman's ANOVA (when normality condition was not met). Post-hoc comparisons were made using the Bonferroni test or Wilcoxon pairwise comparisons depending on whether the normality condition was met or not. Mauchly's sphericity test was also performed to check the equality of variances of different levels. If the hypothesis of meeting the sphericity condition was rejected, the Greenhouse–Geisser correction was performed. An alpha of <0.05 was taken as a statistically significant value. The ES – partial eta square was interpreted as follows: <0.01 *no effect*; 0.01–0.06 *small effect*; 0.06–0.14 *moderate effect*; >0.14 *large effect*. In turn, Kendall W was as follows: <0.1 *no effect*; 0.1–0.3 *small effect*; 0.3–0.5 *moderate effect*; >0.5 *large effect*. In addition, a correlation analysis was conducted between the post-exercise R_{Time} , M_{Time} , V_{cop} and $Area_{95}$ and RPE, FGB_{Total} and HR_{max} using Spearman's rho correlation coefficient.

3. Results

3.1. Discipline-specific CrossFit/HIFT performance test

There were significantly more repetitions in FGB_{Total} in all treatments compared to BASE. Although, there were no significant differences between different CAF doses or PLA, *MEDIUM* CAF dose revealed clinically considerable effectiveness in improving FGB_{Total} scores. Moreover, from the practical point of view, the highest number of repetitions in R_1 and R_2 was observed at 6 mg_{CAF}/kg_{BM} . However, considering statistical significance and FGB rounds' results separately, in R_1 , the highest number of repetitions was observed at 6 and 9 mg_{CAF}/kg_{BM} (and significantly higher compared to PLA and BASE, but comparable to the effect of 3 mg_{CAF}/kg_{BM}). During R_2 , the number of repetitions improved in all treatments compared to BASE; and despite the same median value, 9 mg_{CAF}/kg_{BM} was less effective compared to PLA (but comparable to 3 and 6 mg_{CAF}/kg_{BM}). During R_3 , the number of repetitions improved in all treatments compared to BASE; and PLA was significantly more effective than 9 mg_{CAF}/kg_{BM} , but comparable to 3 and 6 mg_{CAF}/kg_{BM} (Table 2).

Considering particular exercises, the number of *Wall Ball Shots* and *Sumo Deadlift High Pulls* was significantly higher in all treatments compared to BASE in R_2 and R_3 . The number of *Box Jumps* was higher ($p = 0.03$) in 6 mg_{CAF}/kg_{BM} than in 9 mg_{CAF}/kg_{BM} in R_2 ; in turn in R_3 in 6 mg_{CAF}/kg_{BM} and PLA than in BASE; and in PLA compared to 9 mg_{CAF}/kg_{BM} . The number of *Push Presses* in R_1 and R_2 was significantly higher in all conditions than in BASE, and in R_3 in 3, 6 mg_{CAF}/kg_{BM} and PLA than in BASE, and in PLA compared to 9 mg_{CAF}/kg_{BM} . The number of kcal in *Rowing* in R_1 was significantly higher in 9 mg_{CAF}/kg_{BM} than in BASE, in R_2 in all treatments than in BASE, in R_3 in 3, 9 mg_{CAF}/kg_{BM} and PLA compared to BASE (Table 2).

Table 2. Discipline-specific CrossFit/HIIT performance test - *Fight Gone Bad* (FGB) results.

FGB	TREATMENT						χ^2 [p-value]; W
	BASELINE Me $\pm$ IQR	LOW Me $\pm$ IQR	MEDIUM Me $\pm$ IQR	HIGH Me $\pm$ IQR	PLA Me $\pm$ IQR		
Round 1							
Wall Ball Shots [reps]	30.0 $\pm$ 6.0	29.5 $\pm$ 7.0	30.5 $\pm$ 6.0	29.0 $\pm$ 6.0	29.0 $\pm$ 7.0		1.42 [0.84]; 0.01
Sumo Dead Lift High Pulls [reps]	26.5 $\pm$ 8.0	25.5 $\pm$ 9.0	26.5 $\pm$ 4.0	27.0 $\pm$ 8.0	25.0 $\pm$ 6.0		5.23 [0.26]; 0.05
Box Jumps [reps]	19.0 $\pm$ 4.0	18.5 $\pm$ 4.0	19.0 $\pm$ 5.0	20.0 $\pm$ 4.0	17.5 $\pm$ 6.0		3.23 [0.52]; 0.03
Push Presses [reps]	20.0 $\pm$ 5.0 ^{LMHP}	22.0 $\pm$ 10.0 ^B	23.5 $\pm$ 9.0 ^B	25.0 $\pm$ 9.0 ^B	22.0 $\pm$ 8.0 ^B		24.75 [<0.01]; 0.24*
Rowing [cal]	15.5 $\pm$ 6.0 ^H	16.0 $\pm$ 6.0	15.5 $\pm$ 5.0	16.5 $\pm$ 6.0 ^B	15.0 $\pm$ 6.0		5.07 [0.28]; 0.05
Total [reps]	109.0 $\pm$ 24.0 ^{MH,23}	110.5 $\pm$ 22.0 ²³	114.5 $\pm$ 17.0 ^{BP,23}	114.5 $\pm$ 23.0 ^{BP,23}	110.0 $\pm$ 22.0 ^{MH,23}		12.83 [0.01]; 0.12*
Round 2							
Wall Ball Shots [reps]	22.5 $\pm$ 7.0 ^{LMHP}	25.5 $\pm$ 9.0 ^B	25.0 $\pm$ 9.0 ^B	26.0 $\pm$ 9.0 ^B	25.5 $\pm$ 9.0 ^B		29.52 [<0.01]; 0.28*
Sumo Dead Lift High Pulls [reps]	17.0 $\pm$ 6.0 ^{LMHP}	20.0 $\pm$ 6.0 ^B	21.0 $\pm$ 7.0 ^B	21.5 $\pm$ 8.0 ^B	20.0 $\pm$ 6.0 ^B		28.49 [<0.01]; 0.27*
Box Jumps [reps]	16.0 $\pm$ 5.0	17.0 $\pm$ 5.0	17.0 $\pm$ 5.0 ^H	17.0 $\pm$ 4.0 ^M	18.0 $\pm$ 5.0		29.14 [<0.01]; 0.28*
Push Presses [reps]	16.0 $\pm$ 6.0 ^{LMHP}	17.5 $\pm$ 10.0 ^B	18.5 $\pm$ 8.0 ^B	17.5 $\pm$ 8.0 ^{BP}	20.5 $\pm$ 8.0 ^{BH}		36.02 [<0.01]; 0.35*
Rowing [cal]	12.0 $\pm$ 5.0 ^{LMHP}	13.5 $\pm$ 7.0 ^B	13.0 $\pm$ 4.0 ^B	13.0 $\pm$ 6.0 ^B	14.0 $\pm$ 6.0 ^B		20.18 [<0.01]; 0.19*
Total [reps]	81.0 $\pm$ 20.0 ^{LMHP,13}	94.0 $\pm$ 19.0 ^{B,13}	95.0 $\pm$ 15.0 ^{B,13}	93.5 $\pm$ 24.0 ^{BP,13}	93.5 $\pm$ 20.0 ^{BH,13}		47.07 [<0.01]; 0.45*
Round 3							
Wall Ball Shots [reps]	20.0 $\pm$ 8.0 ^{LMHP}	21.5 $\pm$ 8.0 ^B	22.0 $\pm$ 7.0 ^B	20.0 $\pm$ 9.0 ^{BP}	22.0 $\pm$ 7.0 ^{BH}		12.17 [0.02]; 0.12*
Sumo Dead Lift High Pulls [reps]	15.5 $\pm$ 5.0 ^{LMHP}	18.0 $\pm$ 6.0 ^B	19.0 $\pm$ 6.0 ^B	18.5 $\pm$ 6.0 ^B	19.0 $\pm$ 5.0 ^B		26.63 [<0.01]; 0.26*
Box Jumps [reps]	14.5 $\pm$ 5.0 ^{LMHP}	15.5 $\pm$ 5.0	15.5 $\pm$ 5.0 ^B	15.0 $\pm$ 6.0 ^{BP}	16.0 $\pm$ 6.0 ^{BH}		8.79 [0.07]; 0.08
Push Presses [reps]	15.0 $\pm$ 7.0 ^{LMHP}	16.5 $\pm$ 9.0 ^B	17.0 $\pm$ 6.0 ^B	17.0 $\pm$ 8.0 ^P	18.0 $\pm$ 10.0 ^{BH}		15.02 [<0.01]; 0.14*
Rowing [cal]	12.5 $\pm$ 7.0 ^{LHP}	15.0 $\pm$ 5.0 ^B	14.0 $\pm$ 6.0	15.0 $\pm$ 6.0 ^B	15.0 $\pm$ 6.0 ^B		11.79 [0.02]; 0.11*
Total [reps]	78.0 $\pm$ 16.0 ^{LMHP,12}	84.5 $\pm$ 23.0 ^{B,12}	86.0 $\pm$ 18.0 ^{B,12}	83.0 $\pm$ 19.0 ^{BP,12}	86.5 $\pm$ 24.0 ^{BH,12}		26.36 [<0.01]; 0.25*
Rounds 1–3 χ^2 [p-value]; W	36.83 [<0.01]; 0.71*	42.57 [<0.01]; 0.82*	47.59 [<0.01]; 0.91*	49.65 [<0.01]; 0.95*	30.06 [<0.01]; 0.58*		
RPE _{total}	18.5 $\pm$ 2.0	19.0 $\pm$ 2.0	19.0 $\pm$ 2.0	19.0 $\pm$ 2.0	19.0 $\pm$ 2.0		7.32 [0.12]; 0.07
FGB _{total} [reps]	271 $\pm$ 45 ^{LMHP}	290 $\pm$ 55 ^B	294 $\pm$ 57 ^B	293 $\pm$ 67 ^B	289 $\pm$ 66 ^B		19.74 [<0.01]; 0.44*
HR _{mean} during FGB [bpm]	159 $\pm$ 8 ^{LH}	163 $\pm$ 9 ^B	161 $\pm$ 10	163 $\pm$ 9 ^B	161 $\pm$ 8		3.24 [0.03]; 0.11*
HR _{max} during FGB [bpm]	179 $\pm$ 10	179 $\pm$ 8	178 $\pm$ 10	177 $\pm$ 8	179 $\pm$ 11		0.59 [0.58]; 0.02

BASELINE, B – familiarization; LOW, L – 3 mg_{CAF}/kg_{BM}; MEDIUM, M – 6 mg_{CAF}/kg_{BM}; HIGH, H – 9 mg_{CAF}/kg_{BM}; PLA, P – placebo; Me – median; IQR – interquartile range; HR – heart rate; SD – standard deviation; χ^2 – chi-square; RPE – the rate of perceived exertion; FGB – Fight Gone Bad test; HR – heart rate; W – Kendall's coefficient of concordance; F – f distribution; η^2 – partial eta squared; ^{LMHP} – different letter inscriptions refer to statistical differences between treatments (CAF doses, PLA, and baseline); ¹²³ – different number inscriptions refer to statistical differences between rounds; * – statistically significant ($p < 0.05$).

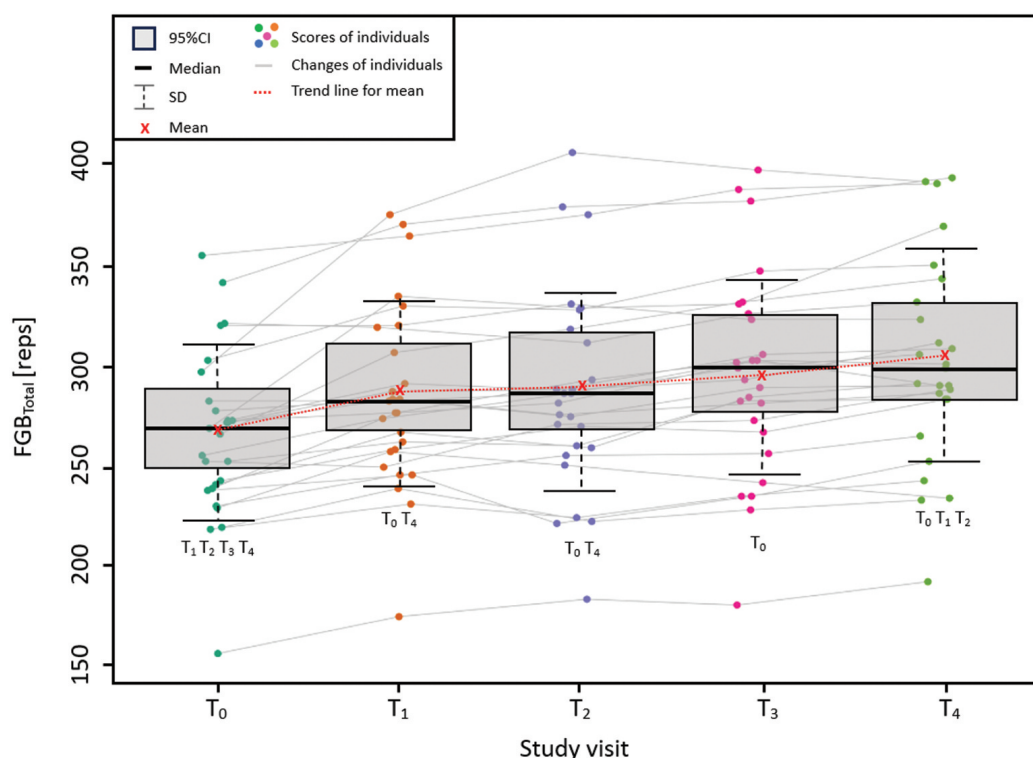


Figure 2. Practice effect analysis for FGB_{Total} results. FGB – Fight Gone Bad test; T_0 – T_4 : order of the study visits in the laboratory.

Regarding the HR and the RPE, there were no significant differences between HR_{mean} , HR_{max} or RPE and CAF/PLA during the whole study protocol. However, in comparison to BASE only HR_{mean} was higher ($p < 0.05$) after 3 and 9 mg/kg $_{BM}$ of CAF (Table 2).

Performed practice effect analysis for FGB_{Total} revealed significant effect [$F(1.83; 48.56) = 33.25$, $p < 0.05$, $\eta = 0.57$] of the practice (the sequence of visits) on the number of repetitions (Figure 2).

Furthermore, in all CAF or PLA treatments, La and Pa concentrations increased significantly from the 1st to the 4th time-point. Pre-exercise La concentration was the highest in 9 mg $_{CAF/kg_{BM}}$; in turn its concentration was significantly lower in PLA compared to CAF treatments and BASE. Post-exercise La concentration was also the highest in 9 mg $_{CAF/kg_{BM}}$. In all CAF treatments, post-exercise La concentration was significantly higher compared to PLA and BASE. Between CAF treatments, significantly higher post-exercise concentration was observed in 9 compared to 3 mg $_{CAF/kg_{BM}}$ (Table 3).

3.2. CYP1A2/ADORA2A polymorphisms and FGB performance test

With regard to CYP1A2 polymorphism, there were six fast metabolizers (AA homozygotes) and twenty “slow metabolizers” (C-allele carriers: 3 CC, 17 AC). With regard to ADORA2A polymorphism, there were four participants having high sensitivity (TT homozygotes) and twenty-two having low sensitivity to CAF (C-allele carriers: 10 CC, 12 CT). There were no significant interactions with CYP1A2 or ADORA2A genotype or CAF dose with FGB_{Total} result (Table 4).

Table 3. Lactate and pyruvate concentrations' results.

	TREATMENT					χ^2 [p-value]; W
	BASELINE Me $\pm$ IQR	LOW Me $\pm$ IQR	MEDIUM Me $\pm$ IQR	HIGH Me $\pm$ IQR	PLA Me $\pm$ IQR	
Lactate concentration [mmol/L]						
Pre-supplementation	1.15 $\pm$ 0.73	1.59 $\pm$ 0.75	1.55 $\pm$ 1.0	1.55 $\pm$ 0.82	1.51 $\pm$ 0.82	2.06 [0.72]; 0.02
30 min after supplementation	1.18 $\pm$ 0.57	1.33 $\pm$ 0.78	1.52 $\pm$ 0.66	1.39 $\pm$ 0.52	1.42 $\pm$ 0.69	6.44 [0.17]; 0.06
60 min after supplementation ^{pre-exercise}	2.63 $\pm$ 1.95 ^P	2.89 $\pm$ 1.39 ^P	2.87 $\pm$ 1.59 ^P	3.04 $\pm$ 2.56 ^P	1.96 $\pm$ 1.10 ^{BLMH}	12.34 [0.02]; 0.12*
3 min after exercise	14.42 $\pm$ 3.01 ^{LMHP}	17.01 $\pm$ 2.63 ^{BHP}	17.40 $\pm$ 4.45 ^{BP}	17.69 $\pm$ 3.73 ^{BLP}	15.34 $\pm$ 3.20 ^{BLMH}	38.06 [<0.01]; 0.47*
Pyruvate concentration [mmol/L]						
Pre-supplementation	0.16 $\pm$ 0.10	0.18 $\pm$ 0.14	0.20 $\pm$ 0.15	0.20 $\pm$ 0.13	0.22 $\pm$ 0.14	4.18 [0.38]; 0.04
30 min after supplementation	0.19 $\pm$ 0.14	0.18 $\pm$ 0.12	0.21 $\pm$ 0.12	0.19 $\pm$ 0.12	0.21 $\pm$ 0.14	4.33 [0.36]; 0.04
60 min after supplementation ^{pre-exercise}	0.26 $\pm$ 0.16	0.25 $\pm$ 0.07	0.29 $\pm$ 0.14	0.28 $\pm$ 0.16	0.22 $\pm$ 0.19	4.64 [0.33]; 0.04
3 min after exercise	0.49 $\pm$ 0.40	0.45 $\pm$ 0.30	0.61 $\pm$ 0.27	0.49 $\pm$ 0.38	0.57 $\pm$ 0.40	6.85 [0.14]; 0.07

BASELINE, B – familiarization; LOW, L – 3 mg_{CAF}/kg_{BM}; MEDIUM, M – 6 mg_{CAF}/kg_{BM}; HIGH, H – 9 mg_{CAF}/kg_{BM}; PLA, P – placebo; Me – median; IQR – interquartile range; χ^2 – chi-square; W – Kendall's coefficient of concordance; ^{BLMHP} – different letter inscriptions refer to statistical differences between treatments (CAF doses, PLA, and baseline); * – statistically significant ($p < 0.05$).

Table 4. Measurements of FGB_{Total} in participants with different CYP1A2 (rs762551) and ADORA2A genotypes (rs5751876).

	TREATMENT					F [p-value]; η^2
	BASELINE Mean $\pm$ SD	LOW Mean $\pm$ SD	MEDIUM Mean $\pm$ SD	HIGH Mean $\pm$ SD	PLA Mean $\pm$ SD	
FGB _{Total} by CYP1A2 genotype						
Fast ($n = 6$, AA) [reps]	250 $\pm$ 23	261 $\pm$ 29	271 $\pm$ 33	277 $\pm$ 30	271 $\pm$ 28	1.96 [0.14]; 0.08
Slow ($n = 20$, 3 CC, 17 AC) [reps]	274 $\pm$ 47	306 $\pm$ 57	306 $\pm$ 50	300 $\pm$ 55	305 $\pm$ 58	
FGB _{Total} by ADORA2A genotype						
High ($n = 4$, TT) [reps]	260 $\pm$ 82	268 $\pm$ 68	284 $\pm$ 68	271 $\pm$ 71	276 $\pm$ 69	1.30 [0.28]; 0.05
Low ($n = 22$, 10 CC, 12 CT) [reps]	270 $\pm$ 36	300 $\pm$ 52	301 $\pm$ 45	299 $\pm$ 47	301 $\pm$ 52	

BASELINE, B – familiarization; LOW – 3 mg_{CAF}/kg_{BM}; MEDIUM – 6 mg_{CAF}/kg_{BM}; HIGH – 9 mg_{CAF}/kg_{BM}; PLA, P – placebo; FGB – Fight Gone Bad test; SD – standard deviation.
F – f distribution; η^2 – partial eta squared; $p < 0.05$.

3.3. Reaction time and postural stability tests

The shortest pre- and post-exercise R_{Time} were observed in 6 mg_{CAF}/kg_{BM}, but the only significant difference was observed in pre-exercise R_{Time} in BASE compared to 9 mg_{CAF}/kg_{BM} (significantly slower). The significant change from Pre_{FGB} to Post_{FGB} R_{Time} was observed only in 9 mg_{CAF}/kg_{BM} (significantly slower post exercise). The lowest pre-exercise variability R_{Time} was observed in BASE and 3 mg_{CAF}/kg_{BM}; in turn post-exercise in 6 mg_{CAF}/kg_{BM}, but there were no significant differences between treatments. Beneficial lack of deterioration was observed only in 6 mg_{CAF}/kg_{BM}, whereas the significant change from Pre_{FGB} to Post_{FGB} variability R_{Time} was observed in 3, 9 mg_{CAF}/kg_{BM}, PLA and BASE (Table 5).

The shortest pre-exercise M_{Time} was observed in 6 mg_{CAF}/kg_{BM} and post-exercise in 3 mg_{CAF}/kg_{BM}, but there were no significant differences between treatments. The lowest pre- and post-exercise variability M_{Time} was observed in 6 mg_{CAF}/kg_{BM}; there was a significantly higher pre-exercise variability M_{Time} in BASE compared to all other treatments. The significant change from Pre_{FGB} to Post_{FGB} M_{Time} and variability M_{Time} was observed in all CAF/PLA treatments, but not in BASE (Table 5).

There were significant differences in Vcop and Area95 between time-points in every condition. The worst results (the highest Area95 and Vcop) were recorded immediately post-exercise (time-point 3: Vcop, Area95). There were no statistically significant differences at this time-point between CAF doses, PLA and BASE. Vcop₁ (35 min after supplementation) was statistically higher in all CAF treatments and BASE compared to PLA; moreover 3 mg_{CAF}/kg_{BM} was characterized by higher velocity of COP than 6 mg_{CAF}/kg_{BM} (Table 5).

3.4. Correlations

There were small positive correlations between HR_{max} and: a) Vcop₃, b) AREA95₃, c) VMT_{POST}, d) AREA 95₃₋₄, which implies a worsening of the results as HR_{max} increased. Furthermore, small/medium negative correlations were observed between: RPE and AREA 95₃, as well as FGB_{Total} and: a) $R_{Time-POST}$, b) $VR_{Time-POST}$, c) $M_{Time-POST}$, d) $VM_{Time-POST}$, which means that as the FGB_{Total} and RPE increased, the indicated correlated values also improved. It is suggested that if the variabilities of postural stability (Vcop and AREA95)

Table 5. Reaction time and postural stability results.

	TREATMENT					
	BASELINE Me±IQR	LOW Me±IQR	MEDIUM Me±IQR	HIGH Me±IQR	PLA Me±IQR	χ^2 [p-value]; W
REACTION TIME (R_{Time})						
Pre _{FCB} [ms]	254.0 ± 55.0 ^H	249.5 ± 35.0	243.5 ± 47.0	250.5 ± 35.0 ^B	250.0 ± 42.0	10.08 [0.04]; 0.10*
Post _{FCB} [ms]	251.0 ± 53.0	249.0 ± 67.0	246.5 ± 59.0	251.0 ± 50.0	252.0 ± 73.0	0.56 [0.97]; 0.01
Pre _{FCB} -Post _{FCB} d_{ME} [95%CI]; p-value	3.0 [-9.0;15.0]; 0.51	1.0 [-14.0;5.0]; 0.48	-4.0 [-17.0;1.0]; 0.05	-11.5 [-24.0;-5.0]; 0.01*	1.5 [-17.0;9.0]; 0.45	
Variability Pre _{FCB} [ms]	25.0 ± 9.0	25.0 ± 12.0	27.5 ± 9.0	27.5 ± 17.0	27.0 ± 9.0	2.54 [0.64]; 0.02
Variability Post _{FCB} [ms]	31.0 ± 17.0	34.0 ± 15.0	30.0 ± 13.0	31.5 ± 13.0	30.5 ± 12.0	2.06 [0.73]; 0.02
Variability Pre _{FCB} -Post _{FCB} d_{ME} [95%CI]; p-value	-5.0 [-11.0;-3.0]; <0.01*	-6.0 [-13.0;-2.0]; <0.01*	-2.5 [-8.0;1.0]; 0.07	-4.0 [-8.0;0.0]; <0.01*	-3.5 [-6.0;0.0]; 0.04*	
MOTOR TIME (M_{Time})						
Pre _{FCB} [ms]	111.0 ± 34.0 ^{L,MH}	108.0 ± 37.0 ^B	110.0 ± 42.0 ^B	102.0 ± 42.0 ^B	109.0 ± 45.0	13.71 [<0.01]; 0.13*
Post _{FCB} [ms]	101.0 ± 59.0	104.5 ± 46.0	110.0 ± 51.0	107.5 ± 5.0	108.0 ± 59.0	3.18 [0.53]; 0.03
Pre _{FCB} -Post _{FCB} d_{ME} [95%CI]; p-value	3.0 [0.0;17.0]; 0.16	-9.0 [-21.0;3.0]; <0.01*	-7.0 [-19.0;0.0]; 0.02*	-9.0 [-18.0;1.0]; 0.01*	-6.0 [-17.0;1.0]; 0.04*	
Variability Pre _{FCB} [ms]	15.5 ± 7.0 ^{L,MHP}	12.0 ± 6.0 ^B	11.5 ± 5.0 ^B	12.0 ± 5.0 ^B	13.0 ± 5.0 ^B	16.17 [<0.01]; 0.16*
Variability Post _{FCB} [ms]	15.5 ± 10.0	15.0 ± 7.0	14.0 ± 6.0	14.5 ± 6.0	16.0 ± 8.0	4.57 [0.33]; 0.04
Variability Pre _{FCB} -Post _{FCB} d_{ME} [95%CI]; p-value	0.0 [-6.0;2.0]; 0.59	-3.0 [-5.0;-2.0]; <0.01*	-1.5 [-7.0;0.0]; 0.01*	-2.5 [-5.0;1.0]; 0.01*	-2.0 [-5.0;1.0]; <0.01*	
COP VELOCITY (Vcop)						
1 (35 min after supplementation) [cm/s]	3.95 ± 1.09 ^{P,34}	3.68 ± 1.02 ^{MP,34}	3.93 ± 1.27 ^{L,P,34}	3.99 ± 1.01 ^{P,34}	3.47 ± 1.04 ^{BL,MH,34}	20.22 [<0.01]; 0.19*
2 (65 min after supplementation, pre-exercise) [cm/s]	3.63 ± 1.31 ³⁴	3.65 ± 1.20 ³⁴	3.71 ± 1.08 ³⁴	3.89 ± 0.82 ³⁴	3.64 ± 0.96 ³⁴	6.54 [0.16]; 0.06
3 (immediately after exercise) [cm/s]	5.63 ± 1.85 ¹²⁴	5.07 ± 1.73 ¹²⁴	5.45 ± 1.82 ¹²⁴	5.20 ± 1.73 ¹²⁴	4.93 ± 1.34 ¹²⁴	5.26 [0.26]; 0.05
4 (10 min after exercise) [cm/s]	4.5 ± 1.36 ¹²³	4.40 ± 1.24 ¹²³	4.26 ± 1.64 ¹²³	4.55 ± 1.67 ¹²³	4.14 ± 0.94 ¹²³	7.72 [0.10]; 0.07
Total 1-4 χ^2 [p-value]; W	44.77 [<0.01]; 0.57*	46.06 [<0.01]; 0.59*	42.97 [<0.01]; 0.55*	44.45 [<0.01]; 0.57*	5.17 [<0.01]; 0.64*	

(Continued)

**Table 5.** (Continued).

	TREATMENT					χ^2 [p-value]; W
	BASELINE Me $\pm$ IQR	LOW Me $\pm$ IQR	MEDIUM Me $\pm$ IQR	HIGH Me $\pm$ IQR	PLA Me $\pm$ IQR	
COP AREA 95% (Area95)						
1 (35 min after supplementation) [cm ²]	8.90 $\pm$ 3.88 ³⁴	7.97 $\pm$ 3.78 ³	8.45 $\pm$ 2.79 ³	8.51 $\pm$ 5.27 ³	8.09 $\pm$ 5.58 ³	1.55 [0.82]; 0.01
2 (65 min after supplementation, pre-exercise) [cm ²]	7.06 $\pm$ 5.34 ³⁴	8.66 $\pm$ 5.53 ³	8.40 $\pm$ 3.86 ³	7.92 $\pm$ 5.24 ³	7.71 $\pm$ 2.58 ³	2.98 [0.56]; 0.03
3 (immediately after exercise) [cm ²]	14.75 $\pm$ 8.20 ¹²⁴	14.13 $\pm$ 9.28 ¹²⁴	13.87 $\pm$ 6.48 ¹²⁴	13.99 $\pm$ 5.04 ¹²⁴	10.79 $\pm$ 7.95 ¹²⁴	3.82 [0.43]; 0.04
4 (10 min after exercise) [cm ²]	9.60 $\pm$ 6.05 ¹²³	8.99 $\pm$ 5.20 ³	8.65 $\pm$ 4.02 ³	8.32 $\pm$ 5.05 ³	8.87 $\pm$ 4.14 ³	3.29 [0.51]; 0.03
Total 1–4 χ^2 [p-value]; W	39.65 [<0.01]; 0.51*	26.41 [<0.01]; 0.34*	33.72 [<0.01]; 0.43*	29.68 [<0.01]; 0.38*	21.09 [<0.01]; 0.27*	

BASELINE, B – familiarization; LOW, L – 3 mg_{CAF}/kg_{BMi}; MEDIUM, M – 6 mg_{CAF}/kg_{BMi}; HIGH, H – 9 mg_{CAF}/kg_{BMi}; PLA, P – placebo; Me – median; IQR – interquartile range; SD – standard deviation; χ^2 – chi-square; W – Kendall's coefficient of concordance; 95%CI – 95% confidence interval; dME – median difference; p – p-value; FGB – Fight Gone Bad exercise test; PreFGB – 65 min after supplementation, pre-exercise; PostFGB – immediately after exercise; 1 – 35 min after supplementation, 2 – 65 min after supplementation, pre-exercise, 3 – immediately after exercise, 4 – 10 min after exercise; BLMHP – different letter inscriptions refer to statistical differences between CAF doses; 123 – different number inscriptions refer to statistical differences between different time-points of Vcop or Area95; * – statistically significant (p-value <0.05)

Table 6. Correlations between selected results.

	RPE rho [p-value]	FGB _{Total} rho [p-value]	HR _{max} rho [p-value]
Vcop ₃	−0.08 [0.93]	0.020 [0.84]	0.225 [0.02]*
Vcop ₄	−0.075 [0.45]	0.044 [0.65]	0.124 [0.21]
Area95 ₃	−0.208 [0.03]*	−0.060 [0.55]	0.216 [0.03]*
Area95 ₄	−0.102 [0.30]	−0.116 [0.24]	−0.06 [0.95]
R _{Time} -Post _{FGB}	0.06 [0.95]	−0.208 [0.03]*	−0.106 [0.29]
VR _{Time} -Post _{FGB}	0.150 [0.13]	−0.310 [0.01]*	0.030 [0.76]
M _{Time} -Post _{FGB}	0.059 [0.55]	−0.228 [0.02]*	−0.072 [0.47]
VM _{Time} -Post _{FGB}	−0.163 [0.10]	−0.329 [<0.01]*	0.227 [0.02]*
Area95 ₃₋₄	−0.117 [0.24]	0.086 [0.39]	0.291 [0.03]*
Vcop ₃₋₄	0.028 [0.78]	−0.135 [0.17]	0.192 [0.05]
RPE	–	−0.011 [0.90]	−0.093 [0.29]
HR _{max}	−0.093 [0.29]	−0.014 [0.87]	–

rho – Spearman correlation coefficient; RPE – the rate of perceived exertion; FGB – Fight Gone Bad test; HR – heart rate; Vcop – COP VELOCITY; Area95 – COP AREA 95%; R_{Time} – reaction time; M_{Time} – motor time; VR_{Time} – variability of reaction time; VM_{Time} – variability of motor time; 3 – immediately after exercise, 4 – 10 min after exercise; Pre_{FGB} – 65 min after supplementation, pre-exercise; Post_{FGB} – immediately after exercise; * – statistically significant ($p < 0.05$).

are higher, the total postural stability is worse; and if the variabilities of R_{Time} and M_{Time} are higher, the R_{Time} is slower. This specific sequence of events (tests number 3 and 4 occurring immediately after FGB) allows to speculate the observed correlations as a cause-and-effect phenomenon (Table 6).

4. Discussion

The aim of this study was to evaluate the effects of three different doses of acute CAF supplementation (3, 6 and 9 mg_{CAF}/kg_{BM}) in CrossFit/HIFT-trained participants. The primary outcome was the effect on specific performance, R_{Time} and P_{Stab}. The secondary outcomes were HR, RPE, lactate and pyruvate concentrations, and SNPs in *CYP1A2* and *ADORA2A* genes. It was hypothesized that different doses of CAF would affect the outcomes differently and performance effects would be dependent on SNPs in *CYP1A2* and *ADORA2A* genes. The hypothesis was not supported, as no significant differences in CrossFit/HIFT performance, R_{Time} or P_{Stab} between CAF doses and its dependence on SNPs were observed. Nevertheless, from the clinical and athletic point of view the *MEDIUM* dose of CAF (6 mg_{CAF}/kg_{BM}) showed the highest effectiveness in improving the total number of repetitions in the whole FGB, in round 1 and 2, as well as in pre-exercise R_{Time} and M_{Time}. Moreover, a significant practice effect was observed between study visits. To the best of the authors' knowledge, this is the first study to determine the effects of three different doses of CAF on specific performance validated FGB test, R_{Time} and P_{Stab} in CrossFit/HIFT practitioners.

Currently, there are only four other [26–29] studies assessing the effects of CAF supplementation in CrossFit/HIFT-trained participants. Nevertheless, none of them used different doses of CAF and incorporated validated discipline-specific FGB exercise test to assess performance. As mentioned above, our study showed that although 6 mg_{CAF}/kg_{BM} was clinically the most effective – no significant differences between different CAF doses were observed. On the other hand, no favorable effect of higher dose (9 mg_{CAF}/kg_{BM}) than recommended was showed. It is important to note that the

whole FGB test lasted for 17 min (15 min of active work with 2 min of rest between rounds) and the *MEDIUM* CAF dose was the most effective during the first two rounds, which indicates that the highest usually recommended CAF dose in sport may be the most effective during early stages of longer CrossFit/HIFT performance or be more effective in shorter exercise tasks. Similarly to our results, Fogaca et al. [26] found no effect of 6 mg/kg_{BM} of CAF compared to PLA on CrossFit performance measured by the test based on 10 min of as many repetitions/rounds as possible (AMRAP) of double-unders and power snatches. Moreover, there was no effect on muscle strength (hand-grip strength) and power (bench throw, jump squat and countermovement jump) in CrossFit participants. Furthermore, in study by Stein et al. [27] acute supplementation of 5 mg_{CAF}/kg_{BM} in comparison to PLA ingested before Cindy benchmark workout did not improve performance. In another study assessing CrossFit performance by Cindy workout, Ziyaiyan et al. [28] examined the effect of 6 mg_{CAF}/kg_{BM} in comparison to NaHCO₃ ingestion separately and in combination. The results indicated that all conditions improved exercise performance compared to PLA, but did not reveal a significant effect of supplementation or any statistically significant differences between supplementations. However, this benchmark workout provides a unique high-volume muscular endurance challenge as it lasts 20 min and requires from the participants to complete AMRAP of 3 exercises (5 pull-ups, 10 push-ups, 15 air squats). The fourth study, by Caetano et al. [29] assessed the effect of 6 mg/kg_{BM} of CAF on one Repetition Maximum (RM) back squat test and local muscular endurance measured based on repetitions using a percentage derived from the 1RM test results. Authors found that local muscular endurance score and the average number of repetitions were higher for the CAF group compared to PLA.

Studies on the effect of CAF on exercise performance are abundant. Nevertheless, even though there are a lot of meta-analyses examining the same outcome, they may have produced conflicting findings. Recently, Grgic et al. [1] published an umbrella review on the ergogenicity of CAF, which helped to overcome potential limitations of previous meta-analyses. ESs of positive effects of CAF from analyzed meta-analyses ranged from *very small* to *moderate* (d Cohen) [1,30]. The results of aforementioned umbrella review were divided concerning the type of exercise. With regard to aerobic endurance, the majority of studies reported *small–moderate* ergogenic effects of CAF (ES range: 0.22–0.61). Analyses examining the effects of CAF on different measures of muscle strength observed *very small–small* ergogenic effect (ES range: 0.16–0.20). In turn, the effects of CAF on muscular endurance were reported as *small* (ES range: 0.28–0.38). Other results of ergogenic effects of CAF on mean and peak power were defined as *very small–small* (ES range: 0.18–0.27), on vertical jump height as *very small* (ES: 0.17), on speed running, cycling, or rowing as *small* (ES: 0.41), and on various forms of short-term high-intensity exercise (time to exhaustion, mean and peak power output, time trial) as *very small* (ES: 0.16) [1]. In summary, CAF is ergogenic for different components of exercise performance (aerobic and muscle endurance, muscle strength, power, jumping performance and exercise speed). Interestingly, it can be assumed that CAF not only provides a performance-enhancing effect on aerobic exercise performance, but also on anaerobic exercise tasks [1,3].

The importance of *CYP1A2* and *ADORA2A* SNPs on performance still remains unclear, therefore genotypic limitations that prevent CAF from exerting its ergogenic effects are

constantly discussed [31]. Moreover, it is speculated that possible positive effects are higher in males compared to females and there may be inter-individual variation in CAF ergogenicity [14]. Additionally, it is important to note that because of the differences in the proportions of the individual SNPs in the world population, it is difficult to capture their actual impact. For instance, following the Hardy-Weinberg principle, the frequency of *CYP1A2* SNP in the population is approximately 45% for AAs, 45% for ACs and 10% for CCs [3].

Initial data from the meta-analysis by Barreto et al. [30] suggests that regarding rs762551 *CYP1A2* polymorphism, AA homozygotes may benefit most from CAF supplementation, whether for CC homozygotes CAF is ergolytic. Indeed, studies by Guest et al. [12], Womack et al. [32] or Wong et al. [33] support greater ergogenic benefits of CAF supplementation in fast metabolizers than in C-allele carriers. Nevertheless, the majority of studies do not support this hypothesis [24,34–37]. Regarding rs5751876 *ADORA2A* polymorphism, only one pilot study [38] showed that genotypes may have an influence on performance and C-allele carriers can be identified as non-responders, whereas in TT homozygotes intensive exercise improved. However, other studies [34,36,39] did not replicate these results, showing no beneficial effects of CAF were influenced by *ADORA2A* genotypes [3]. Similarly to other studies, our results showed no effect of *CYP1A2* or *ADORA2A* SNPs on performance, even with the implementation of different CAF doses.

The current study showed that the highest post-exercise *La* concentration was observed in the *HIGH* CAF dose (9 mg_{CAF}/kg_{BM}). Elevation in blood *La* often, but not always, accompanies CAF supplementation. At rest, CAF has no effect on *La*, meaning that to achieve the response, some mechanical stress is mandatory [40]. Although some studies have observed a significant increase in *La* [41,42], others have found no effect of CAF on *La* during submaximal exercise [43,44]. Even though the possible increase can be explained by a concomitant CAF-induced increase in performance [41,43], the mechanism underlying this increase is not so obvious [40]. CAF may increase *La* through adrenaline mediation or stimulation of CNS dampening pain perception, which extends the duration of exercise resulting in greater *La* accumulation [45]. Graham et al. [42] did not attribute the CAF-induced increase in *La* during submaximal exercise to an increase in production or release by the active muscles. Nevertheless, it may have been caused by the fact that CAF may impair *La* clearance; or insufficient sensitivity to detect changes in muscle *La* production and release resulting from CAF; or by the fact that *La* is being produced from inactive muscles. The first possibility is the most plausible, because, although it is hard to identify the precise mechanism, adenosine signaling has been shown to stimulate gluconeogenesis, which accounts for 20–30% of *La* clearance during exercise [40]. On the contrary to Graham et al. [42], Glaister et al. [40] found no effect of CAF on the rate of *La* clearance in recovery, suggesting that an increase in *La* efflux from the working muscles caused the elevation in blood *La*, supporting the idea of a CAF-stimulated increase in glycolysis rate. Furthermore, it is known that the conversion of *La* to *Pa* occurs substantially in working muscles and that on net bases *La* and *Pa* are released at similar rates. Moreover, arterial *La* is a major source of *Pa* released from muscles, but the majority of venous *Pa* is cleared before entry into arterial circulation [46]. Indeed, studies support the *Pa* increase during exercise [20,47]. Similar to the

data from the literature, our results showed the increase in Pa during the study protocol, nevertheless there was no effect of different CAF doses on its concentration.

There were no differences in RPE between CAF doses and PLA. Although CAF did not affect RPE significantly, better performance after *MEDIUM* dose of CAF supplementation may suggest a central effect resulting in greater overall exercise intensity at the same RPE. It is speculated that multi-joint exercises may increase RPE [48]. The only existing meta-analysis on CAF and RPE [49] suggested that CAF RPE was lower than PLA RPE during constant load exercise, but no corresponding difference between CAF and PLA RPE at the conclusion of exhausting exercise was found. The authors explained that the reason may be due to a dampening of the perceptual response during exercise. The results of the current study incorporated the standard 6–20 Borg scale. Unfortunately, three other CrossFit CAF studies used a different, 10-point scale. Stein et al. [27] utilized a 10-point Likert scale that may have not been sensitive enough to capture changes during the protocol. In mentioned study, no significant differences in RPE between CAF and PLA conditions were observed. Similarly, Fogaca et al. [26] reported no difference in post-workout RPE between CAF and PLA conditions, but using the CR10 Borg Scale. In turn, Ziyaiyan et al. [28] recorded RPE on a scale of 1–10 and showed that the combination of CAF and NaHCO_3 significantly reduced RPE in comparison to the control and PLA conditions. Similarly, other investigations, outside CrossFit/HIFT area, did not report any effect of CAF on RPE [26,50]. It can be concluded that the effects of CAF on RPE provide mixed results [48], when different exercise protocols are utilized. Crawford et al. [51] in a study on the RPE utilization in CrossFit suggested that a 15-point scale may be more appropriate in CrossFit athletes. Thus, since RPE is usually taken after the exercise bout, new studies might consider additional measurements of during-workout exertion.

Due to CNS activation, mainly through catecholamine release and adrenal cortex stimulation through corticoid release, CAF ingestion can influence HR at rest and during exercise. These processes result in adjustments to the cardiac autonomic modulation that induce consequent tachycardias [52]. With regard to meta-analysis by Benjamin et al. [53] it was concluded that HR increases during exercise and throughout the recovery after CAF ingestion. Moreover, it was indicated that CAF has the capacity to influence HR before, during, and after exercise. In our study, we measured total HR_{mean} during exercise and HR_{max} , but surprisingly there were no differences between CAF doses and PLA. Unfortunately, only one other CAF CrossFit study measured HR changes during exercise protocol. Ziyaiyan et al. [28] found that HR_{max} at the end of the workout was significantly different between conditions, with emphasis on significantly greater value in CAF and CAF + NaHCO_3 group compared to control. Based on the sports literature, CAF has equivocal effects on HR during periods of exercise. Our previous study in judo [18] showed that 6 and 9 $\text{mg}_{\text{CAF}}/\text{kg}_{\text{BM}}$ increased HR right after and 1 min after exercise test compared to 3 $\text{mg}_{\text{CAF}}/\text{kg}_{\text{BM}}$, and 9 $\text{mg}_{\text{CAF}}/\text{kg}_{\text{BM}}$ compared to PLA. Smirmaul et al. [54] reported the HR-increasing effect of CAF during cycling, suggesting that differences in HR_{max} were rather related to CAF than to exercise performance. Moreover, Bunsawat et al. [52] and Lopes-Silva et al. [55] showed higher HR in CAF group (HR_{max} and HR_{mean} , respectively). On the contrary, Glaister et al. [40] found that during early stages of performance test CAF demonstrated lower HR. Other studies [56,57], similarly to our results, found no differences in HR_{max} between CAF and PLA groups.

Recent meta-analysis [8] on CAF and cognitive functions in sports revealed an improvement in response to CAF intake across a variety of cognitive domains. Analyzed studies showed a positive effect of CAF on relatively higher-order processes (visual selective attention measured by Stroop test and flanker task), with more pronounced effects in modalities with lower attention demands [8]. Research examined simple psychomotor speed (simple R_{Time}), complex decision speed and decision-making time (choice R_{Time}), complex response preparation speed (S-R incompatible CR_{Time}) by simple visual R_{Time} test, motor CR_{Time} test and CR_{Time} test. It was concluded that CAF intake may improve simple R_{Time} and choice R_{Time} , but it may depend on the exercise protocol. Importantly, it was revealed that a single acute dose of CAF is safe in some aspects of performance cognitive functions [8]. It was also suggested that CAF effect on R_{Time} may be a result of its effect on perceptual-attentional processes, rather than motor processes [58]. In our study, there were no significant differences in R_{Time} and M_{Time} between different CAF doses and PLA, although *MEDIUM* dose showed clinically important shorter pre-exercise R_{Time} and M_{Time} . Interestingly, variability R_{Time} at this dose was maintained despite exercise, whereas the other doses and PLA or BASE resulted in a significant decrease in variability M_{Time} immediately after exercise. In study by Share et al. [59] no effect of CAF intake (2 and 4 mg_{CAF}/kg_{BM}) on clay target shooting, such as R_{Time} and target tracking time was detected. Church et al. [60] observed no difference in the ability to track multiple objects in response to 3 mg_{CAF}/kg_{BM} 60 min before exercise. Although CAF may improve overall processing speed in tasks requiring higher-order functions, this cannot be attributed to specific effects on selective visual attention. Moreover, even though CAF may reduce response times and error rates in simple R_{Time} and CR_{Time} , recent meta-analysis revealed that this may not translate into exercise [8]. Crowe et al. [61] using the simple visual R_{Time} test showed that CAF did not speed up cognitive R_{Time} , although the effect might have been blunted because of the timing of CAF intake (90 min before the test). Russel et al. [62] analyzed CAF in chewing gum in rugby players and found no *treatment x time* interaction in simple R_{Time} . Church et al. [60] and Share et al. [59] also found no differences between CAF and PLA in non-standardized measure to test separately upper and lower body R_{Time} . Moreover, Ali et al. [63] found no effect of 6 mg_{CAF}/kg_{BM} on complex decision-making capacity measured by CR_{Time} test. On the other hand, Bello et al. [10] found that 3.69 mg/kg_{BM} of CAF in soccer players improved simple psychomotor speed performance, CR_{Time} and cognitive load R_{Time} . Hogervorst et al. [9] found that complex psychomotor speed and S-R incompatible choice speed, measured by motor CR_{Time} test, were significantly faster in *LOW* dose CAF than in PLA group. Interestingly, when assessing *CYP1A2* genotype variations no differences between AA homozygotes and C-allele carriers with regard to R_{Time} after CAF were found [64].

Our results revealed no effect of CAF or any differences between doses with regard to indices of P_{Stab} (Area95 and V_{cop}). Nevertheless, while there were no significant differences between doses and PLA, it is noteworthy (looking only at post-exercise results) that PLA was exceptionally better than any other dose, both for V_{cop} and for Area95, which could confirm the effect of CAF on the CNS. Unfortunately, there are no other studies on the effect of CAF on balance with regard to exercise performance tests. Results of the systematic review by Briggs et al. [11] on the effects of CAF ingestion on human standing balance indicated that younger participants' balance was generally unaffected by CAF ingestion. Nevertheless, a significant impairment was observed in older participants. This suggests the possibility

of an age-dependent effect of CAF on standing. Moreover, CAF should be considered as a potential confounding factor when assessing standing balance. Taking into account studies only in younger adults population, 100–500 mg of CAF 30–80 min after intake had no effect on balance when standing with eyes open or closed on a firm surface [65–68] or with a visual surround that moved with the body or during conditions designed to reduce proprioceptive information regarding body sway [67]. Waer et al. [68] reported no significant effect of 100 or 400 mg of CAF on standing with eyes open on a foam surface, but significantly reduced by 16% body sway derived from center of pressure with eyes closed following 100 mg of CAF.

4.1. Limitations

It should be noted that our research had some limitations. Firstly, we assessed the effect of the dose-dependent CAF supplementation in moderately trained athletes. It is possible that CAF effect may differ according to training experience and that highly trained/elite contestants may be more responsive to CAF, which was showed in our previous study in judo [18]. Still, the evidence is conflicting. Nevertheless, it is worth noting that since CrossFit/HIFT has become popular worldwide, most of the participants train moderately, thus in our opinion it is important to find new ergogenic solutions also for them. Secondly, we observed FGB practice effect between study meetings, which was previously seen by Stein et al. [27] in CrossFit participants. Interestingly, some authors [69] recommend at least two familiarization sessions to decrease the influence of this effect, especially in participants that are unaccustomed to exercise protocols. Nevertheless, on the contrary to other researchers, our studied participants were familiar with the efforts performed, which should have eliminated the learning effect. We also performed one familiarization session, which allowed the participants to get acquainted with the Department's performance lab. Despite, the practice effect, CAF-induced improvement in specific performance may affect the result during competition. Moreover, we were not able to perform sex-dependent analyses differentiating CAF effects between sexes (uneven groups). This was caused by unwillingness of females to perform such a performance-demanding protocol. Finally, we accounted for practice effect only for FGB results. Nevertheless, each participant visited the laboratory five times and at each study visit we administered a single CAF or PLA dose to each participant. Moreover, it is possible that although we calculated the minimum sample size, a larger sample size would make certain differences more apparent.

4.2. Strengths

The unquestionable strength of our study was a multi-crossover design protocol and implementation of three different CAF doses, as well as PLA, in CrossFit/HIFT-trained practitioners with a complex assessment of specific performance, by a validated exercise test, and R_{Time} and P_{Stab} , both before and after exercise. Secondly, we have taken into account SNPs of *CYP1A2* and *ADORA2A* genotypes and their role in CAF ergogenic effects (although the small number of participants per genotype may be a limitation). Thirdly, we are convinced that the implemented 7-day washout period was sufficient to remove CAF-induced ergogenic effect, since the half-life of CAF is 2.5–10 h [2]. Moreover, because the study protocols were performed strictly at the same time for each of the participants, we limited the effect of circadian rhythm on CAF activity and guaranteed the proper standardization. In addition, we calculated the minimum sample size, which was met by the number of participants who took part in the study.

Furthermore, all study participants were habitual CAF users, who refrained from CAF-containing products before study visits, which limited the possibility of other factors influencing the results. We also ensured a full compliance with the intake of supplements and a thorough procedures' standardization.

5. Conclusion

In conclusion, the present study does not confirm dose-dependent effect of CAF supplementation in moderately trained CrossFit/HIFT participants. There was no evidence of a difference between CAF doses and PLA on specific-performance, R_{Time} , P_{Stab} , RPE or HR, as well as *CYP1A2* and *ADORA2A* genotypes with regard to CAF supplementation. Nevertheless, the *MEDIUM* dose of CAF – 6 mg_{CAF}/kg_{BM} induced clinically noticeable improvements in FGB, R_{Time} and M_{Time} , which implicates that from the practical and athletic point of view this dose may be the most effective for CrossFit/HIFT practitioners.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

Funding

This work was supported by own resources of the Department of Sports Dietetics.

ORCID

Natalia Głowska  <http://orcid.org/0000-0001-8449-7162>
Jakub Malik  <http://orcid.org/0000-0002-5633-1672>
Tomasz Podgórski  <http://orcid.org/0000-0003-0745-4606>
Rafał Stemplewski  <http://orcid.org/0000-0002-0260-6378>
Janusz Maciaszek  <http://orcid.org/0000-0001-8425-5921>
Julia Ciężyńska  <http://orcid.org/0000-0001-9065-9164>
Emilia E. Zawieja  <http://orcid.org/0000-0002-9030-1805>
Agata Chmurzynska  <http://orcid.org/0000-0002-2045-0709>
Paulina M. Nowaczyk  <http://orcid.org/0000-0001-7724-022X>
Krzysztof Durkalec-Michalski  <http://orcid.org/0000-0002-5041-2981>

Author contributions

Study design/planning: N.G., K.D.-M.; data collection/entry: N.G., J.Mal., T.P., R.S., J.Mac., J.C., E.E.Z., A. C., P.M.N., K.D.-M.; data analysis/statistics: N.G., J.Mal., R.S.; data interpretation: N.G., J.Mal., K.D.-M.; preparation of the first draft version of the manuscript: N.G., J.Mal., K.D.-M.; literature analysis/search: N.G., J.Mal.; collection of funds: N.G., K.D.-M. All authors were involved in drafting versions and critically revising for important intellectual content. All authors have contributed and approved the final version.

Clinical trial registration

This trial was registered prospectively at ClinicalTrials.gov (NCT03822663).

Data availability statement

The results of the study are presented clearly, honestly, and without fabrication, falsification, or inappropriate data manipulation. The deidentified data are available from the corresponding author upon reasonable request.

References

1. Grgic J, Grgic I, Pickering C, et al. Wake up and smell the coffee: caffeine supplementation and exercise performance—an umbrella review of 21 published meta-analyses. *Br J Sports Med.* 2020;54(11):681–688. doi: [10.1136/bjsports-2018-100278](https://doi.org/10.1136/bjsports-2018-100278)
2. Guest NS, VanDusseldorp TA, Nelson MT, et al. International society of sports nutrition position stand: caffeine and exercise performance. *J Int Soc Sports Nutr.* 2021;18(1):1. doi: [10.1186/s12970-020-00383-4](https://doi.org/10.1186/s12970-020-00383-4)
3. Saunders B, da Costa LR, de Souza RAS, et al. Chapter three - caffeine and sport. Editor(s): Fidel Toldrá. *Adv Food Nutr Res.* 2023;106:95–127. Academic Press.
4. Dexheimer JD, Schroeder ET, Sawyer BJ, et al. Physiological performance measures as indicators of Crossfit® performance. *Sports.* 2019;7(4):93. doi: [10.3390/sports7040093](https://doi.org/10.3390/sports7040093)
5. Feito Y, Heinrich KM, Butcher SJ, et al. High-Intensity Functional Training (HIFT): definition and research implications for improved fitness. *Sports.* 2018;6(3):76. doi: [10.3390/sports6030076](https://doi.org/10.3390/sports6030076)
6. Kapsis DP, Tsoukos A, Psarraki MP, et al. Changes in body composition and strength after 12 weeks of high-intensity functional training with two different loads in physically active men and women: a randomized controlled study. *Sports.* 2022;10(1):7. doi: [10.3390/sports10010007](https://doi.org/10.3390/sports10010007)
7. Durkalec-Michalski K, Zawieja EE, Zawieja BE, et al. Evaluation of the repeatability and reliability of the cross-training specific fight gone bad workout and its relation to aerobic fitness. *Sci Rep.* 2021;11(1):7263. doi: [10.1038/s41598-021-86660-x](https://doi.org/10.1038/s41598-021-86660-x)
8. Lorenzo Calvo J, Fei X, Domínguez R, et al. Caffeine and cognitive functions in sports: a systematic review and meta-analysis. *Nutrients.* 2021;13(3):868. doi: [10.3390/nu13030868](https://doi.org/10.3390/nu13030868)
9. Hogervorst E, Riedel WJ, Kovacs E, et al. Caffeine improves cognitive performance after strenuous physical exercise. *Int J Sports Med.* 1999;20(6):354–361. doi: [10.1055/s-2007-971144](https://doi.org/10.1055/s-2007-971144)
10. Bello ML, Walker AJ, McFadden BA, et al. The effects of TeaCrine® and caffeine on endurance and cognitive performance during a simulated match in high-level soccer players. *J Int Soc Sports Nutr.* 2019;16(1):20. doi: [10.1186/s12970-019-0287-6](https://doi.org/10.1186/s12970-019-0287-6)
11. Briggs I, Chidley JB, Chidley C, et al. Effects of caffeine ingestion on human standing balance: a systematic review of placebo-controlled trials. *Nutrients.* 2021;13(10):3527. doi: [10.3390/nu13103527](https://doi.org/10.3390/nu13103527)
12. Guest N, Corey P, Vescovi J, et al. Caffeine, CYP1A2 genotype, and endurance performance in athletes. *Med Sci Sports Exerc.* 2018;50(8):1570–1578. doi: [10.1249/MSS.0000000000001596](https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000001596)
13. Barreto G, Grecco B, Merola P, et al. Novel insights on caffeine supplementation, CYP1A2 genotype, physiological responses and exercise performance. *Eur J Appl Physiol.* 2021;121(3):749–769. doi: [10.1007/s00421-020-04571-7](https://doi.org/10.1007/s00421-020-04571-7)
14. Nehlig A, Alexander SPH. Interindividual differences in caffeine metabolism and factors driving caffeine consumption. *Pharmacol Rev.* 2018;70(2):384–411. doi: [10.1124/pr.117.014407](https://doi.org/10.1124/pr.117.014407)

15. Magkos F, Kavouras SA. Caffeine use in sports, pharmacokinetics in man, and cellular mechanisms of action. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2005;45(7–8):535–562. doi: [10.1080/1040-830491379245](https://doi.org/10.1080/1040-830491379245)
16. Durkalec-Michalski K, Kamińska J, Saunders B, et al. Does sodium bicarbonate based extra-cellular buffering support reduce high intensity exercise-induced fatigue and enhance short-term recovery assessed by selected blood biochemical indices? *Biol Sport.* 2023;41(1):17–27. doi: [10.5114/biolsport.2024.125591](https://doi.org/10.5114/biolsport.2024.125591)
17. Durkalec-Michalski K, Domagalski A, Głowska N, et al. Effect of a four-week vegan diet on performance, training efficiency and blood biochemical indices in crossfit-trained participants. *Nutrients.* 2022;14(4):894. doi: [10.3390/nu14040894](https://doi.org/10.3390/nu14040894)
18. Durkalec-Michalski K, Nowaczyk PM, Głowska N, et al. Dose-dependent effect of caffeine supplementation on judo-specific performance and training activity: a randomized placebo-controlled crossover trial. *J Int Soc Sports Nutr.* 2019;16(1):38. doi: [10.1186/s12970-019-0305-8](https://doi.org/10.1186/s12970-019-0305-8)
19. Nieber K. The impact of coffee on health. *Planta Med.* 2017;83(16):1256–1263. doi: [10.1055/s-0043-115007](https://doi.org/10.1055/s-0043-115007)
20. Durkalec-Michalski K, Zawieja EE, Podgórski T, et al. The effect of chronic progressive-dose sodium bicarbonate ingestion on CrossFit-like performance: a double-blind, randomized cross-over trial. *PloS One.* 2018;13(5):e0197480. doi: [10.1371/journal.pone.0197480](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197480)
21. Baláková V, Boschek P, Skalíková L. Selected cognitive abilities in elite youth soccer players. *J Hum Kinet.* 2015;49(1):267–276. doi: [10.1515/hukin-2015-0129](https://doi.org/10.1515/hukin-2015-0129)
22. Bonnet CT. Advantages and disadvantages of stiffness instructions when studying postural control. *Gait Posture.* 2016;46:208–210. doi: [10.1016/j.gaitpost.2015.12.026](https://doi.org/10.1016/j.gaitpost.2015.12.026)
23. van Melick N, Meddeler BM, Hoogeboom TJ, et al. How to determine leg dominance: the agreement between self-reported and observed performance in healthy adults. *PloS One.* 2017;12(12):e0189876. doi: [10.1371/journal.pone.0189876](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189876)
24. Zawieja E, Chmurszyska A, Anioła J, et al. The effect of caffeine supplementation on resistance and jumping exercise: the interaction with CYP1A2 and ADORA2A genotypes. *Nutraceuticals.* 2023;3(2):274–289. doi: [10.3390/nutraceuticals3020022](https://doi.org/10.3390/nutraceuticals3020022)
25. Kim HY. Statistical notes for clinical researchers: assessing normal distribution (2) using skewness and kurtosis. *Restor Dent Endod.* 2013;38(1):52–54. doi: [10.5395/rde.2013.38.1.52](https://doi.org/10.5395/rde.2013.38.1.52)
26. Fogaça LJ, Santos SL, Soares RC, et al. Effect of caffeine supplementation on exercise performance, power, markers of muscle damage, and perceived exertion in trained CrossFit men: a randomized, double-blind, placebo-controlled crossover trial. *J Sports Med Phys Fitness.* 2020;60(2):181–188. doi: [10.23736/S0022-4707.19.10043-6](https://doi.org/10.23736/S0022-4707.19.10043-6)
27. Stein JA, Ramirez M, Heinrich KM. Acute caffeine supplementation does not improve performance in trained Crossfit® athletes. *Sports.* 2020;8(4):54. doi: [10.3390/sports8040054](https://doi.org/10.3390/sports8040054)
28. Ziyaiyan A, Shabkhiz F, Hofmeister M. Supplementation of caffeine and sodium bicarbonate together could not improve performance and performance-related factors in CrossFit participants: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Int Soc Sports Nutr.* 2023;20(1):2206390. doi: [10.1080/15502783.2023.2206390](https://doi.org/10.1080/15502783.2023.2206390)
29. Caetano ML, Souza MLR, Loureiro LL, et al. The effects of acute caffeine supplementation on performance in trained CrossFit® athletes: a randomized, double-blind, placebo-controlled, and crossover trial. *Science & Sports.* 2023;38(7):701–707. doi: [10.1016/j.scispo.2022.04.007](https://doi.org/10.1016/j.scispo.2022.04.007)
30. Barreto G, Esteves G, Marticorena F, et al. Caffeine, CYP1A2 genotype and exercise performance: a systematic review and meta-analysis. *Med Sci Sports Exerc.* 2023; Epub ahead of print. PMID: 37844569.
31. Fulton JL, Dinas PC, Carrillo AE, et al. Impact of genetic variability on physiological responses to caffeine in humans: a systematic review. *Nutrients.* 2018;10(10):1373. doi: [10.3390/nu10101373](https://doi.org/10.3390/nu10101373)
32. Womack CJ, Saunders MJ, Bechtel MK, et al. The influence of a CYP1A2 polymorphism on the ergogenic effects of caffeine. *J Int Soc Sports Nutr.* 2012;9(1):7. doi: [10.1186/1550-2783-9-7](https://doi.org/10.1186/1550-2783-9-7)

33. Wong O, Marshall K, Sicova M, et al. CYP1A2 genotype modifies the effects of caffeine compared with placebo on muscle strength in competitive male athletes. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 2021;31(5):420–426. doi: [10.1123/ijsnem.2020-0395](https://doi.org/10.1123/ijsnem.2020-0395)
34. Carswell AT, Howland K, Martinez-Gonzalez B, et al. The effect of caffeine on cognitive performance is influenced by CYP1A2 but not ADORA2A genotype, yet neither genotype affects exercise performance in healthy adults. *Eur J Appl Physiol.* 2020;120(7):1495–1508. doi: [10.1007/s00421-020-04384-8](https://doi.org/10.1007/s00421-020-04384-8)
35. Giersch GEW, Boyett JC, Hargens TA, et al. The effect of the CYP1A2 –163 C > a polymorphism on caffeine metabolism and subsequent cycling performance. *J Caffeine Adenosine Res.* 2018;8(2):65–70. doi: [10.1089/caff.2017.0028](https://doi.org/10.1089/caff.2017.0028)
36. Glaister M, Chopra K, Pereira De Sena AL, et al. Caffeine, exercise physiology, and time-trial performance: no effect of ADORA2A or CYP1A2 genotypes. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2021;46(6):541–551. doi: [10.1139/apnm-2020-0551](https://doi.org/10.1139/apnm-2020-0551)
37. Grgic J, Pickering C, Bishop DJ, et al. CYP1A2 genotype and acute effects of caffeine on resistance exercise, jumping, and sprinting performance. *J Int Soc Sports Nutr.* 2020;17(1):21. doi: [10.1186/s12970-020-00349-6](https://doi.org/10.1186/s12970-020-00349-6)
38. Loy BD, O'Connor PJ, Lindheimer JB, et al. Caffeine is ergogenic for adenosine A2A receptor gene (ADORA2A) t allele homozygotes: a pilot study. *J Caffeine Res.* 2015;5(2):73–81. doi: [10.1089/jcr.2014.0035](https://doi.org/10.1089/jcr.2014.0035)
39. Muñoz A, López-Samanes Á, Aguilar-Navarro M, et al. Effects of CYP1A2 and ADORA2A genotypes on the ergogenic response to caffeine in professional handball players. *Genes.* 2020;11(8):933. doi: [10.3390/genes11080933](https://doi.org/10.3390/genes11080933)
40. Glaister M, Williams BH, Muniz-Pumares D, et al. The effects of caffeine supplementation on physiological responses to submaximal exercise in endurance-trained men. *PloS One.* 2016;11(8):e0161375. doi: [10.1371/journal.pone.0161375](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161375)
41. Black CD, Waddell DE, Gonglach AR. Caffeine's ergogenic effects on cycling: neuromuscular and perceptual factors. *Med Sci Sports Exerc.* 2015;47(6):1145–1158. doi: [10.1249/MSS.0000000000000513](https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000000513)
42. Graham TE, Helge JW, MacLean DA, et al. Caffeine ingestion does not alter carbohydrate or fat metabolism in human skeletal muscle during exercise. *J Physiol.* 2000;529(Pt 3):837–847. doi: [10.1111/j.1469-7793.2000.00837.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.00837.x)
43. Stadheim HK, Kvamme B, Olsen R, et al. Caffeine increases performance in cross-country double-poling time trial exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 2013;45(11):2175–2183. doi: [10.1249/MSS.0b013e3182967948](https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e3182967948)
44. Simmonds MJ, Minahan CL, Sabapathy S. Caffeine improves supramaximal cycling but not the rate of anaerobic energy release. *Eur J Appl Physiol.* 2010;109(2):287–295. doi: [10.1007/s00421-009-1351-8](https://doi.org/10.1007/s00421-009-1351-8)
45. Davis JK, Green JM. Caffeine and anaerobic performance: ergogenic value and mechanisms of action. *Sports Med.* 2009;39(10):813–832. doi: [10.2165/11317770-000000000-00000](https://doi.org/10.2165/11317770-000000000-00000)
46. Henderson GC, Horning MA, Lehman SL, et al. Pyruvate shuttling during rest and exercise before and after endurance training in men. *J Appl Physiol.* 2004;97(1):317–325. (1985). doi: [10.1152/japplphysiol.01367.2003](https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01367.2003)
47. Podgorski T, Adrian J, Nowak A. Changes in lactate, pyruvate and glucose levels in field hockey players under different training and match stimuli. *Trends Sport Sci.* 2015;3(22):145–152.
48. Grgic J, Mikulic P, Schoenfeld BJ, et al. The influence of caffeine supplementation on resistance exercise: a review. *Sports Med.* 2019;49(1):17–30. doi: [10.1007/s40279-018-0997-y](https://doi.org/10.1007/s40279-018-0997-y)
49. Doherty M, Smith PM. Effects of caffeine ingestion on rating of perceived exertion during and after exercise: a meta-analysis. *Scand J Med Sci Sports.* 2005;15(2):69–78. doi: [10.1111/j.1600-0838.2005.00445.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0838.2005.00445.x)
50. Duncan MJ, Oxford SW. The effect of caffeine ingestion on mood state and bench press performance to failure. *J Strength Cond Res.* 2011;25(1):178–185. doi: [10.1519/JSC.0b013e318201bddb](https://doi.org/10.1519/JSC.0b013e318201bddb)

51. Crawford DA, Drake NB, Carper MJ, et al. Validity, reliability, and application of the session-RPE method for quantifying training loads during high intensity functional training. *Sports*. 2018;6(3):84. doi: [10.3390/sports6030084](https://doi.org/10.3390/sports6030084)
52. Bunsawat K, White DW, Kappus RM, et al. Caffeine delays autonomic recovery following acute exercise. *Eur J Prev Cardiol*. 2015;22(11):1473–1479. doi: [10.1177/2047487314554867](https://doi.org/10.1177/2047487314554867)
53. Benjamim CJR, Kliszczewicz B, Garner DM, et al. Is caffeine recommended before exercise? a systematic review to investigate its impact on cardiac autonomic control via heart rate and its variability. *J Am Coll Nutr*. 2020;39(6):563–573. doi: [10.1080/07315724.2019.1705201](https://doi.org/10.1080/07315724.2019.1705201)
54. Smirmaul BPC, de Moraes AC, Angius L, et al. Effects of caffeine on neuromuscular fatigue and performance during high-intensity cycling exercise in moderate hypoxia. *Eur J Appl Physiol*. 2017;117(1):27–38. doi: [10.1007/s00421-016-3496-6](https://doi.org/10.1007/s00421-016-3496-6)
55. Lopes-Silva JP, Silva Santos JF, Branco BHM, et al. Caffeine ingestion increases estimated glycolytic metabolism during taekwondo combat simulation but does not improve performance or parasympathetic reactivation. *PloS One*. 2015;10(11):e0142078. doi: [10.1371/journal.pone.0142078](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142078)
56. Gonzaga LA, Vanderlei LCM, Gomes RL, et al. Caffeine affects autonomic control of heart rate and blood pressure recovery after aerobic exercise in young adults: a crossover study. *Sci Rep*. 2017;7(1):14091. doi: [10.1038/s41598-017-14540-4](https://doi.org/10.1038/s41598-017-14540-4)
57. Kliszczewicz B, Bechke E, Williamson C, et al. The influence of citrus aurantium and caffeine complex versus placebo on the cardiac autonomic response: a double blind crossover design. *J Int Soc Sports Nutr*. 2018;15(1):34. doi: [10.1186/s12970-018-0240-0](https://doi.org/10.1186/s12970-018-0240-0)
58. Saville CWN, de Morree HM, Dundon NM, et al. Effects of caffeine on reaction time are mediated by attentional rather than motor processes. *Psychopharmacol (Berl)*. 2018;235(3):749–759. doi: [10.1007/s00213-017-4790-7](https://doi.org/10.1007/s00213-017-4790-7)
59. Share B, Sanders N, Kemp J. Caffeine and performance in clay target shooting. *J Sports Sci*. 2009;27(6):661–666. doi: [10.1080/02640410902741068](https://doi.org/10.1080/02640410902741068)
60. Church DD, Hoffman JR, LaMonica MB, et al. The effect of an acute ingestion of Turkish coffee on reaction time and time trial performance. *J Int Soc Sports Nutr*. 2015;12(1):37. doi: [10.1186/s12970-015-0098-3](https://doi.org/10.1186/s12970-015-0098-3)
61. Crowe MJ, Leicht AS, Spinks WL. Physiological and cognitive responses to caffeine during repeated, high-intensity exercise. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*. 2006;16(5):528–544. doi: [10.1123/ijsnem.16.5.528](https://doi.org/10.1123/ijsnem.16.5.528)
62. Russell M, Reynolds NA, Crewther BT, et al. Physiological and performance effects of caffeine gum consumed during a simulated half-time by professional academy rugby union players. *J Strength Cond Res*. 2020;34(1):145–151. doi: [10.1519/JSC.0000000000002185](https://doi.org/10.1519/JSC.0000000000002185)
63. Ali, A, O'Donnell, J, Von Hurst, P, et al. Caffeine ingestion enhances perceptual responses during intermittent exercise in female team-game players. *J Sports Sci*. 2016;34(4):330–341. doi: [10.1080/02640414.2015.1052746](https://doi.org/10.1080/02640414.2015.1052746)
64. Salinero JJ, Lara B, Ruiz-Vicente D, et al. CYP1A2 genotype variations do not modify the benefits and drawbacks of caffeine during exercise: a pilot study. *Nutrients*. 2017;9(3):269. doi: [10.3390/nu9030269](https://doi.org/10.3390/nu9030269)
65. Nuotto E, Mattila MJ, Seppälä T, et al. Coffee and caffeine and alcohol effects on psychomotor function. *Clin Pharmacol Ther*. 1982;31(1):68–76. doi: [10.1038/clpt.1982.11](https://doi.org/10.1038/clpt.1982.11)
66. Swift CG, Tiplady B. The effects of age on the response to caffeine. *Psychopharmacol (Berl)*. 1988;94(1):29–31. doi: [10.1007/BF00735876](https://doi.org/10.1007/BF00735876)
67. Liguori A, Robinson JH. Caffeine antagonism of alcohol-induced driving impairment. *Drug Alcohol Depend*. 2001;63(2):123–129. doi: [10.1016/S0376-8716\(00\)00196-4](https://doi.org/10.1016/S0376-8716(00)00196-4)
68. Ben Waer F, Laatar R, Srihi S, et al. Acute effects of low versus high caffeine dose consumption on postural balance in middle-aged women. *J Women Aging*. 2021;33(6):620–634. doi: [10.1080/08952841.2020.1735288](https://doi.org/10.1080/08952841.2020.1735288)
69. Glaister M. Multiple-sprint work: methodological, physiological, and experimental issues. *Int J Sports Physiol Perform*. 2008;3(1):107–112. doi: [10.1123/ijsp.3.1.107](https://doi.org/10.1123/ijsp.3.1.107)

RESEARCH

Open Access



The effect of caffeine dose on caffeine and paraxanthine changes in serum and saliva and CYP1A2 enzyme activity in athletes: a randomized placebo-controlled crossover trial

Natalia Główka^{1*}, Jakub Malik², Jacek Anioła³, Emilia E. Zawieja³, Agata Chmurzynska³ and Krzysztof Durkalec-Michalski^{1,4*}

Abstract

Background Although caffeine (CAF) supplementation has been shown to improve exercise performance, its dose-dependent effect on CAF metabolism has not been sufficiently investigated. The aim of this study was to evaluate the effects of 3, 6 and 9 mg of CAF/kg_{BM} on changes of CAF and paraxanthine (PRX) in the serum and saliva at four time-points.

Methods In a randomized, double-blind, placebo-controlled crossover design, acute pre-exercise supplementation in 26 moderately-trained athletes, participating in high-intensity functional training (HIFT), was examined. The study protocol involved CAF/PRX biochemical analyses of serum and saliva with respect to CYP1A2 polymorphism and CYP1A2 enzyme activity.

Results Despite significant differences between the serum and saliva levels of CAF and PRX, there was no difference in the PRX/CAF ratio. The interaction effect of dose and time-points for PRX concentration was revealed. The main effects of dose were observed for CAF and the PRX/CAF ratio. The main effect of time-points was registered only for serum CAF.

Conclusions Dose- and time-dependent effect of CAF supplementation on CAF and PRX in the serum and saliva of athletes was confirmed, but there was no effect of the CAF dose on CYP1A2 enzyme activity, nor was there an interaction of CYP1A2 with enzyme inducibility. The CAF/PRX correlation indicated the possibility of interchangeable use of serum and/or saliva analyses in exercise studies.

*Correspondence:
Natalia Główka
glowka@awf.poznan.pl
Krzysztof Durkalec-Michalski
durkalec-michalski@awf.poznan.pl

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2024. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License, which permits any non-commercial use, sharing, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if you modified the licensed material. You do not have permission under this licence to share adapted material derived from this article or parts of it. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.

Clinical trial registration This trial was registered prospectively at ClinicalTrials.gov (NCT03822663, registration date: 30/01/2019).

Keywords Enzyme activity, Ergogenic support, High-intensity functional training, Metabolism, Sports dietetics, Supplementation

Introduction

Caffeine [(1,3,7-trimethylxanthine), CAF] is a purine alkaloid that exerts a wide range of psychophysiological effects, which might be partly influenced by its intake variation between individuals. Its consumption in humans commonly occurs via the ingestion of coffee and several other foods and beverages (e.g., cocoa, green tea, chocolate, guarana berries, yerba mate, kola nuts) [1, 2].

CAF is rapidly absorbed in the gastrointestinal tract [approximately 99% within 45 min, mainly in the small intestine or in the stomach], which is independent of sex, age, genetic factors, diseases or exposure to nicotine, alcohol or drugs [1]. However, the time of absorption depends on the CAF-based product; for example, CAF from the capsule is absorbed in 30 min, whereas that from the cola or chocolate is absorbed in 1.5–2 h. Its maximum concentration is reduced by approximately 25% for drinks in comparison to ~2.05 µg/mL for a capsule [1]. Although CAF is mainly absorbed via the gastrointestinal tract (80% via the small intestine and 20% via the stomach) [1, 3], recently it has been hypothesized that CAF absorption via the oral mucosa can play a role in enhancing exercise performance. Although it is not clear how much of CAF may be absorbed through oral mucosa, research demonstrated that delivering CAF in alternate forms, like in a chewing gum, may speed the rate of its delivery to the blood by absorption through the buccal mucosa [4, 5]. It may occur due to the extensive vascularization in this region. This rapid absorption is particularly relevant for athletes, as it can lead to quicker improvements in reaction time and cognitive alertness during exercise, which are crucial for performance [6]. After CAF enters the tissue water compartment, it is evenly distributed in body fluids, but it does not accumulate in the body. Because of its lipophilic character, CAF is able to cross all cellular membranes, in contrast to its metabolites. A blood/plasma ratio close to 1 reflects free movement into/out blood cells and limited plasma protein binding [1]. CAF is excreted through the renal system. Approximately 70% of its dosage is recovered in urine, with 0.5–2% being excreted unmetabolized in urine [1]. Notably, approximately 98% of CAF is reabsorbed from the renal tube, which explains the low level of CAF urine excretion. Additionally, 2–7% of the CAF dose is excreted in feces over 48 h, which consists mainly of CAF metabolites from the liver–intestine cycle and metabolism [1, 2].

CAF is eliminated via first-order kinetics at dosages of 2–10 mg_{CAF}/kg_{BM}; its first-pass metabolism is minimal, and its pharmacokinetics does not depend on the route of administration [1]. It is metabolized primarily in the liver, where it undergoes demethylation and oxidation processes. The majority of CAF is converted in the liver into paraxanthine (PRX, ~81.5%), which is exclusively mediated via the CYP1A2 enzyme and is suggested to be as potent as CAF for the adenosine receptors blockade. Other CAF metabolites, such as theobromine and theophylline, are metabolized by other enzymes. Different factors, such as pregnancy, lifestyle (e.g. smoking), diseases or the environment, may affect CAF metabolism [1, 2]. Interestingly, dose-dependent CAF metabolism has been suggested in several in vivo studies, showing its nonlinear clearance and saturation of 70–300 mg of CAF. The plasma kinetics of CAF may be influenced by the dose, the presence of dietary constituents in the stomach, gastric pathologies or fluid intake, which affect renal clearance and CAF pharmacokinetics [1, 2]. Nevertheless, most of the variations are accounted for by genetics. The peak plasma concentration of CAF is reached at 30–120 min, and the half-time ranges from 1.5 to 10 h [7]. The total plasma clearance of CAF and its main metabolite is identical (2.07–2.20 mL/min/kg_{BM}). The PRX concentration decreases more slowly than the CAF concentration does; in fact, it becomes even higher than the CAF concentration at approximately 8–10 h after CAF ingestion [1, 2]. Moreover, the concentration of CAF in saliva reaches 65–85% of its plasma concentration [1].

Considering that the CYP1A2 enzyme influences the disposition of CAF, one of the important parts of treatment personalization is assessing its enzymatic activity, which depends on several factors, such as sex and race [1]. Moreover, a functional polymorphism in the *CYP1A2* gene may contribute to inter-individual differences in CYP1A2 enzyme activity [8]. The A allele at position –163 (rs762551) leads to lower enzyme inducibility than the C allele does, which is reflected by the urinary or plasma ratio of CAF/metabolites after CAF ingestion. C-allele carriers (AC, CC), who constitute 54% of the population, are referred to as ‘slow metabolizers’. This C variant is associated with slow CAF clearance. In turn, AA homozygotes are considered ‘fast metabolizers’ [1, 2, 9].

The enzyme CYP1A2 is found primarily in the liver, and CAF is the most widely used probe to measure its

activity. The ‘gold standard’ measurement is the apparent clearance of CAF by extensive blood sampling. However, the general enzymatic activity of CYP1A2 can also be measured by the PRX to CAF ratio (PRX/CAF RATIO) after time- and dosage-controlled administration of CAF [10–13] in a number of biological human matrices (such as blood or saliva) and metrics at a single time-point (concentration at a single time-point, C_t), which apparently correlates with clearance. Extensive pharmacokinetics measurements recommend the use of PRX/CAF C_t in serum/plasma at 2, 4, 3–12 or 5–7 h after administration or at 1–2, 2, 5 and 6–10 h in saliva [12]. Nevertheless, although most studies actually use a 6 h time period and PRX/CAF RATIO or CAF-based metabolic phenotyping, there is no clear consensus on such a scientific approach [14]. Moreover, the time- and dose-dependent effects of PRX/CAF RATIO have not been reported thus far and are especially relevant for phenotyping at very low doses [14]. The results from a recent systematic analysis [14] revealed that even though multiple studies and clinical investigations used different dosing protocols, the results of metabolic phenotyping with CAF were very consistent. The correlation coefficients between the CAF and PRX concentrations in saliva and blood/serum were 0.84 and 0.76, respectively. An even stronger correlation (0.88) was found between saliva-based and blood-based CAF clearance. The data indicated that clearance may be calculated from both blood/serum- and saliva-based measurements [14]. In conclusion, the saliva-based metabolic phenotyping approach has a very good correlation with blood-based approaches (as was previously confirmed in non-exercise conditions) [14].

Although both the pharmacokinetics and pharmacodynamics of CAF are well-studied and this ergogenic supplement is widely used in various doses by athletes, data on CAF metabolism under exercise conditions are scarce. Therefore, the aim of the current study was to evaluate the effects of three different doses of acute CAF supplementation on CAF, PRX, and PRX/CAF RATIO changes in serum and saliva at different time-points after supplementation in a group of young, healthy, and moderately trained people participating in high-intensity functional training (HIFT). We also investigated the effects of the CAF dose and single nucleotide polymorphism (SNP) of the *CYP1A2* gene (rs762551) on CYP1A2 enzyme activity, as measured by the mean time-corrected PRX/CAF RATIO in saliva. We hypothesized that a higher CAF dose (9 mg_{CAF}/kg_{BM}) will induce greater CAF and PRX changes in both biological human matrices and that the peak change in CAF concentration from pre-supplementation will be elicited 60 min after intake. Moreover, we hypothesized that a higher CAF dose will affect CYP1A2 enzyme activity more profoundly and that C-allele

carriers will have different CYP1A2 enzyme activity responses than AA homozygotes.

Methods

Study design, protocol and visits

In this randomized, double-blind, placebo-controlled crossover design, three doses of CAF (3, 6, 9 mg_{CAF}/kg_{BM}; *LOW*, *MEDIUM*, and *HIGH*, respectively) or placebo (*PLA*) were acutely supplemented to the participants during the study protocol, which consisted of five visits (T_0 – T_4) to the laboratory (Fig. 1). At the beginning, the volunteers were familiarized with the entire protocol and subsequently subjected to the first visit (T_0 ; baseline (BASE), without supplementation treatment), after which they were randomly assigned (stratified randomization on the basis of exercise performance results) to the treatment order with specific codes by an impartial biostatistician. The main study protocol involved four separate visits (T_1 – T_4) performed at the same time of day for the participant, three hours after a standardized meal (carbohydrates: 2 g/kg_{BM}, proteins: 25 g, water: 7 mL/kg_{BM}) [15, 16]. The participants were aware to avoid any CAF-containing products for the 24 h before the study meeting. Each visit consisted of body composition measurements, the HIFT exercise protocol and blood/saliva sampling. Given the kinetics of CAF excretion from the body, a 7-day washout period was introduced between treatments [17]. Moreover, participants were divided post hoc into groups according to the *CYP1A2* genotype (AA homozygotes and C allele carriers).

The primary outcome in our study was a change from the first time-point (prior to supplement administration) to the next three time-points in terms of the CAF and PRX concentrations and the PRX/CAF RATIO in the serum and saliva. In turn, CYP1A2 enzyme activity and SNP in the *CYP1A2* genotype were defined as secondary outcomes.

Participants

Twenty-six moderately HIFT-trained participants (10 females, 16 males) completed the entire study protocol and were included in the analyses (Fig. 1; Table 1). All the athletes were enrolled from HIFT clubs in Poznań, Poland. The inclusion criteria for participation in the study were good health conditions, a valid and up-to-date medical certificate confirming the athlete’s ability to practice sports, at least 2 years of HIFT training experience, a minimum of 4 workout sessions a week, and a habitual moderate intake of CAF-containing products (which refers to more than two 240 mL cups of coffee, where the typical average CAF content is ~170 mg (range: from 120 to 240 mg)) [18]. The exclusion criteria were current injury, health-related contraindications, a general feeling of being unwell, an unwillingness to follow the study

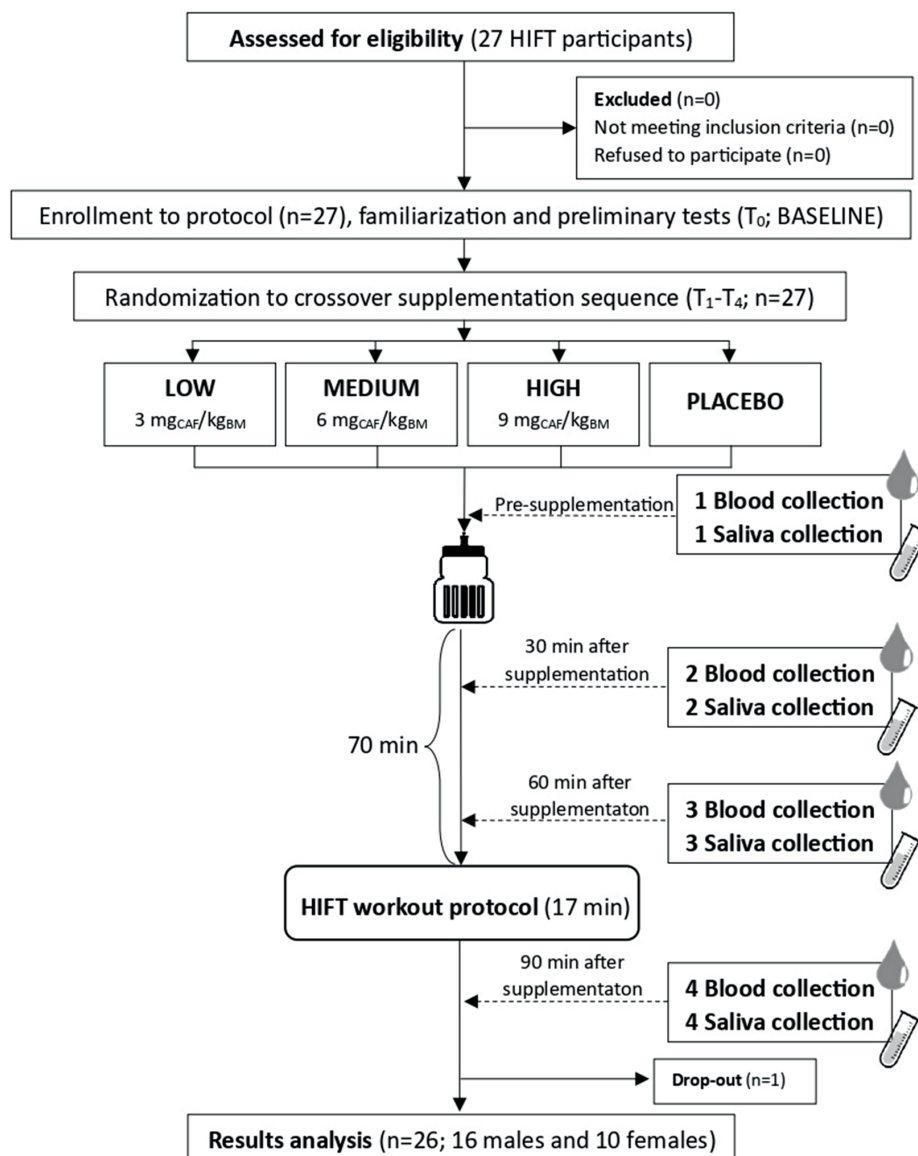


Fig. 1 Flow chart of the study design. HIFT – high-intensity-functional training

protocol, smoking, and failure to adhere to CAF abstinence. The study protocol was conducted from July 2021 to December 2022 at the Department of Sports Dietetics (Poznan University of Physical Education, Poland). This trial was reviewed and approved by the Bioethics Committee at Poznan University of Medical Sciences (reference number 293/17 of May 11, 2017) and was registered prospectively at ClinicalTrials.gov (NCT03822663, registration date: 30/01/2019). The study complies with the CONSORT Statement for randomized trials, as shown in

Fig. 1. All study participants provided written informed consent. All procedures were carried out in accordance with the ethical standards of the Helsinki Declaration of 2013.

Procedures

Supplementation

In the experimental procedure, each participant ingested an acute dose of CAF [3- (*LOW*), 6- (*MEDIUM*) or

Table 1 Baseline characteristics of the studied group ($n = 26$)

Body composition variable	Mean $\pm$ SD
Age [years]	35.4 $\pm$ 6.5
Body mass [kg]	77.4 $\pm$ 16.6
Height [cm]	175 $\pm$ 9
Total Body Water [% , L]	57.2 $\pm$ 5.1, 44.1 $\pm$ 9.7
Fat Mass [% , kg]	19.9 $\pm$ 5.6, 15.5 $\pm$ 6.1
Fat-Free Mass [% , kg]	80.1 $\pm$ 5.7, 61.9 $\pm$ 13.6
Habitual CAF intake [mg/day]*	231 $\pm$ 121
CYP1A2 genotypes	<i>n</i>
'fast metabolizers'	6 AA
'slow metabolizers'	20 (3 CC, 17 AC)

SD – standard deviation, *n* – number of participants, * habitual daily intake, not including the day of the study and the 24 h preceding the visit, when participants were required not to consume any CAF sources

9- (*HIGH*) $\text{mg}_{\text{CAF}}/\text{kg}_{\text{BM}}$] and *PLA* treatment in a cross-over regimen. CAF doses (pure pharmaceutical CAF, Ostrovit, Poland) and *PLA* (bitter aroma) were administered dissolved in 20 mL of orange juice and 80 mL of plain water. The supplements were administered after the first blood sampling, 70 min before the HIFT exercise (Fig. 1), in containers marked with a unique code, made in advance by the researcher who did not directly participate in the investigations. With respect to double blinding, neither the researchers nor the participants knew whether CAF or *PLA* was administered. The randomization details were anonymized and revealed after the cessation of the protocol. The preparations were administered at a strictly specified time before the exercise tests, and consumption compliance was fully controlled by the investigators.

Body composition and nutritional assessment

The anthropometric and body composition measurements and nutritional assessment methods used in this study are thoroughly described elsewhere [19]. At the beginning of each study visit, anthropometric indices were measured in duplicate via a calibrated scale with a stadiometer (WPT 60/150 OW, Radwag[®], Radom, Poland), and bioelectric impedance was measured with a Bodystat 1500 (Bodystat Inc., Douglas, UK). With respect to nutritional assessment, participants completed the special questionnaire prepared for this study for the quantification of daily CAF intake and additionally recorded their diet for the period of two consecutive days before each study visit to ensure 24 h CAF abstinence. The basic results of body composition analysis and habitual CAF intake are presented in Table 1. More detailed information was previously presented [19].

Exercise

HIFT workout protocol, with well-documented high repeatability (ICC 0.9, SEM 6%), was performed for 17 min in accordance with the protocol from our

previous studies [19–22]. Additionally, before its commencement, the participants followed a 20 min self-prepared warm-up, which was the same for a particular participant during every study meeting. The results of the HIFT workout protocol, along with the heart rate and rate of perceived exertion, are published elsewhere [19].

Blood and saliva collection and samples preparation

Capillary blood and saliva samples were obtained at four time-points (1st – pre-supplementation (0'); 2nd – 30 min after supplementation (30'); 3rd – 60 min after supplementation (60'), pre-exercise; 4th – 3 min after exercise (90 min after supplementation, 90')) during every study meeting. All the samples were taken by a medical professional and were obtained with the participants in a seated upright position. Blood samples (600 μL) were collected from a fingertip of the nondominant hand via a disposable lancet-spike Medlance[®] Red (HTL-STREFA, Łódź, Poland) with a 1.5 mm blade and a 2.0 mm penetration depth. The capillary blood was collected into two Microvette[®] CB 300 Serum CAT tubes (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) with a clotting activator, and then the separated serum was used to measure the CAF and PRX concentrations. Saliva samples (1 mL) were collected at the same time-points as blood samples, via saliva receptacles [Salivette[®] swab (Sarstedt, Nümbrecht, Germany)] according to the manufacturer's instructions (the swab was removed from the Salivette[®], then it was placed in the mouth and chewed for approximately 60 s to stimulate salivation, and then the swab with the absorbed saliva was returned to the Salivette[®] and the stopper was replaced). Saliva was extracted by centrifugation for 2 min at $1000 \times g$. Collected serum and saliva samples were frozen and stored at -80°C until further analyses were performed.

CAF and PRX concentrations' determination

Serum and salivary CAF and PRX concentrations ($\mu\text{g}/\text{mL}$) were quantified following liquid–liquid extraction and high-pressure liquid chromatography as described previously [11, 23]. The concentrations were measured via a Hitachi Lachom 7000 high-performance liquid chromatography (HPLC) analyzer (Merck, Darmstadt, Germany), in which a LiChroCART[®]250-4 (LiChrospher[®]100, RP-18, 5 μm , Merck, Darmstadt, Germany) column was used. The mobile phase consisted of acetonitrile–acetic acid– H_2O (100:1:899). CAF, PRX and the internal standard benzotriazole were quantified via UV detection at 280 nm. With an eluent flow rate of 1 mL/min, the retention times were 14 min (CAF) and 7 min (PRX). Additionally, the PRX/CAF RATIO was calculated by simply dividing the concentration of PRX by the concentration of CAF.

CYP1A2 enzyme activity assessment by the determination of the mean time-corrected PRX/CAF RATIO in saliva

Previous analyses concluded that saliva PRX/CAF RATIO 6 h after CAF ingestion has the best correlation to CAF/PRX clearance, providing the most valid CYP1A2 enzyme activity validation [24, 25]. In view of the 4 different time-points of sampling in our current study and the relatively short duration of the study meeting, which prevented sampling 6 h after CAF ingestion, we decided to use a previously described [8] developed method, which enabled adjusting the CYP1A2 enzyme activity via the PRX/CAF RATIO values to the optimal 6 h post-dose sampling time-point. In this method, the equation from the study by Spigset et al. [26] was adapted to estimate PRX/CAF (y) if the time span between CAF intake and sampling (x) was known. It was concluded that a time span of 6 h equates to a mean PRX/CAF of 0.725 [8].

$$y = 0.016 + (0.141 * x) + (-0.004 * x^2)$$

Then, following the instructions, (1) the actual PRX/CAF RATIO was calculated on the basis of the molar concentrations of CAF and PRX. Next, (2) the correct mean PRX/CAF RATIO was estimated as mentioned before. (3) The difference between the actual and correct PRX/CAF RATIO values was subsequently calculated. Finally, (4), the mean time-corrected PRX/CAF RATIO, assuming a 6 h ideal time span, was determined by adding 0.725 to the difference calculated in step 3. In step 2, as x in the equation, we assumed a time span from the 3rd time-point (60 min after supplementation) because the consensus statement on CAF supplementation in sports recommends its intake 60 min before exercise because of its likely highest concentration [7].

CYP1A2 Genotyping

Samples for *CYP1A2* (rs762551) genotyping were collected at the first study visit. The swab was inserted into the mouth and rubbed firmly against the inside of the cheek and underneath the lower and upper lips for 1 min. DNA was isolated from exfoliated buccal epithelial cells via a standard kit (EXTRACTME® Genomic DNA KIT EM13, Blirt S.A., Poland). Genotyping was performed via commercially available TaqMan®SNP genotyping assays (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA; ID C__8881221_40) on a LightCycler 480 instrument (Roche Diagnostics, Switzerland), as described previously [23]. The results of genotyping are presented in Table 1.

Statistical analysis

All analyses were performed in Statistica 13.3 (TIBCO Software Inc. 2017) and RStudio via DescTools (Posit Software, PBC 2009–2023). The Shapiro-Wilk test was used to check the assumption of normality. Data analysis

included both raw data (0', 30', 60', 90') and concentration changes calculated from the difference between the first concentration measurement, prior to supplement ingestion (0'), and subsequent measurements (30', 60', 90'). Correlation analysis, polynomial regression and difference-of-dependent variables analysis (t-test or Wilcoxon test) were used to analyze the raw data. General Linear Model (GLM) was used to analyze differences between change variables. Pearson and Spearman correlations for the assumption of a relationship between concentrations (CAF, PRX or PRX/CAF RATIO) in serum and saliva were used. Polynomial regression was performed for the differences in the CAF and PRX concentrations between the serum and saliva samples but not for the PRX/CAF RATIO, because of the level of model fit. For raw data correlation, difference and polynomial regression analysis, 520 variables were compared (without splitting the data into groups by dose). The GLM considered two within-group factors [dose: D (LOW, MEDIUM, HIGH, PLA); time-point: TP (30', 60', 90')] and one between-group factor [CYP1A2: C (SLOW, FAST)]. D*TP and D*TP*C interactions were also analyzed. If the sphericity condition was not met, the Huynh-Feldt correction was applied. Significant GLM results were further subjected to Bonferroni post hoc pairwise comparison analysis. An alpha level of 0.05 was considered the cutoff point for statistical significance. The means with standard deviations (SD) were presented in the tables and figures. Additional GLM analysis was performed on the transformed data, taking into account the predicted concentrations at 6 h after supplementation ingestion. For this purpose, the data were transformed from µg/mL to µmol/L, assuming a molar mass PRX of 180 and a CAF of 194 g/mol. Sample size estimation was performed via G*Power software (version 3.1.9.6, Germany). On the basis of the umbrella review [27], a medium effect size (ES): $f(U)=0.38$ was used. A sample size of 26 participants was adequate for this study.

Results

Correlation analysis between the raw result of 0' and changes in 30', 60' and 90' showed significance only in BASE for CAF ($p<0.001$) and PRX ($p=0.015$) and in PLA for CAF ($p=0.006$) but not in LOW, MEDIUM or HIGH dose in both CAF and PRX concentrations, which enabled the utilization of concentration changes calculated from the difference between the first concentration measurement, prior to supplement ingestion (0'), and subsequent measurements (30', 60', 90'). The raw data of the CAF and PRX concentrations and PRX/CAF RATIO, which was not the object of this study, are shown in Supplemental Table S1. Additionally, we did not intend to assess differences between sexes; therefore, neither males nor females were recruited for the study participation in

an intended even distribution. Hence, no sub-analyses of males/females differences were performed. Nevertheless, to clarify we added CAF, PRX and PRX/CAF RATIO and CYP1A2 enzyme activity raw results in all time-points in serum and saliva for all participants together, as well as separately for males and females into Supplemental Table S1.

Polynomial regression (saliva to serum; serum to saliva)

The polynomial regression analysis revealed a statistically significant model for estimation of the CAF concentration from saliva to serum samples ($F(1,517)=619.58$, $p<0.001$, $y=0.1281+1.5082*x-0.0375*x^2$, $R^2=0.79$) and from serum to saliva samples ($F(1,517)=506.32$, $p<0.001$, $y=-0.2465+1.0698*x-0.017*x^2$, $R^2=0.77$) (Fig. 2). The Pearson correlation coefficient between CAF variables in serum and saliva samples was 0.87 (Spearman rho 0.91). Additionally, with respect to the PRX concentration, a significant model of saliva to serum samples ($F(1,517)=210.99$, $p<0.001$, $y=0.0247+1.5501*x-0.1803*x^2$, $R^2=0.61$) and of serum to saliva samples ($F(1,517)=359.81$, $p<0.001$,

$y=0.069+0.8603*x-0.0738*x^2$, $R^2=0.63$) was observed. The Pearson correlation coefficient between the PRX variables in the serum and saliva samples was 0.77 (Spearman rho 0.83). The regression models are shown in Fig. 2.

For the PRX/CAF RATIO variables in both the serum to saliva and of saliva to serum, the distribution obtained did not allow regression analysis to be performed. In this case, the Pearson correlation coefficient was 0.29 (Spearman rho 0.83). Both the CAF and PRX concentrations between the serum and saliva showed a significant difference ($Z=12.37$, $p<0.001$ and $Z=9.52$, $p<0.001$, respectively) in the pairwise comparisons, but for the PRX/CAF RATIO the differences between the serum and saliva were not significant ($Z=1.36$, $p=0.174$).

CAF and PRX concentrations' changes in serum and saliva

GLM analysis of changes under the influence of CAF supplementation for CAF showed significant differences in terms of the D main effect in both the serum ($p<0.001$) and saliva ($p<0.001$) samples and in terms of the time-point main effect but only in the saliva ($p=0.014$) sample.

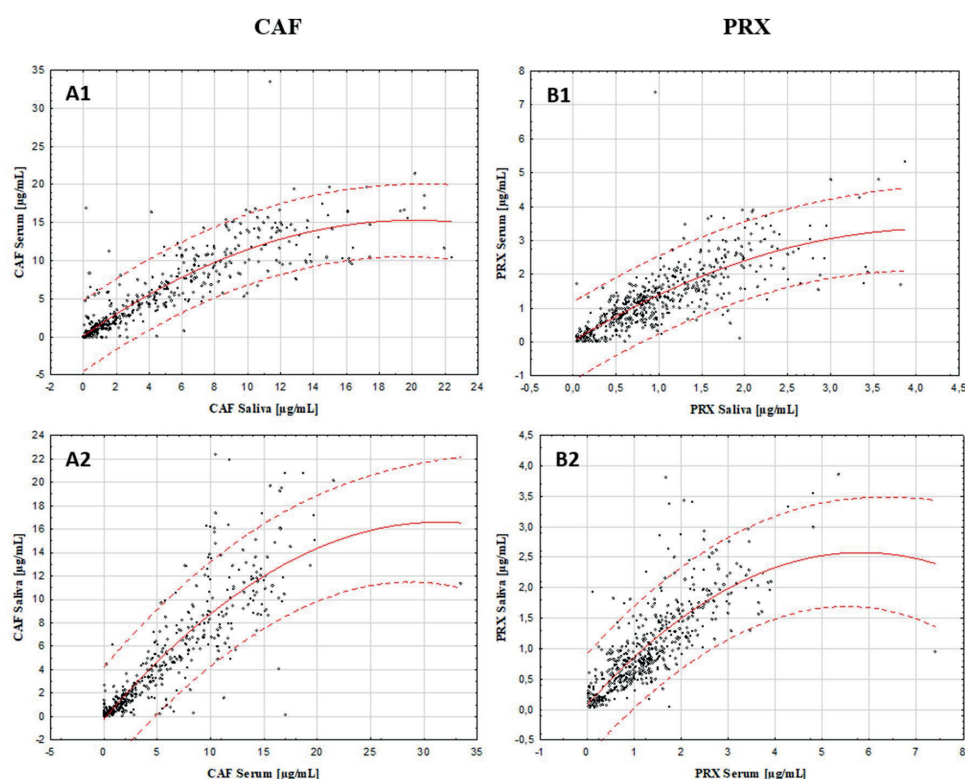


Fig. 2 Regression model with predictions. A1 – CAF concentration of saliva to serum; A2 – CAF concentration of serum to saliva; B1 – PRX concentration of saliva to serum; B2 – PRX concentration of serum to saliva

Table 2 CAF, PRX and PRX/CAF RATIO changes in serum and saliva (µg/mL)

	SERUM				SALIVA		
CAF	1 ³	2 ³	3 ^{1,2}		1 ^{2,3}	2 ¹	3 ¹
LOW ^{M,H,P}	4.13 ± 1.94	3.40 ± 1.70	3.32 ± 1.06	LOW ^{M,H,P}	3.77 ± 2.11	2.90 ± 1.41	2.80 ± 1.50
MEDIUM ^{L,H,P}	10.81 ± 5.60	11.12 ± 4.29	9.96 ± 5.05	MEDIUM ^{L,H,P}	9.59 ± 4.84	7.36 ± 3.16	7.09 ± 2.84
HIGH ^{L,M,P}	12.94 ± 2.04	12.79 ± 0.63	12.27 ± 1.73	HIGH ^{L,M,P}	11.92 ± 4.92	9.94 ± 2.76	10.18 ± 2.66
PLA ^{L,M,H}	-0.09 ± 0.55	-0.27 ± 0.31	-0.40 ± 0.29	PLA ^{L,M,H}	-0.34 ± 0.31	-0.36 ± 0.35	-0.35 ± 0.36
PRX	1	2	3		1	2	3
LOW	0.40 ± 0.26 ^{H,P}	0.37 ± 0.29 ^{3,M,H,P}	0.22 ± 0.32 ^{2,M,H,P}	LOW	0.13 ± 0.43 ³	0.23 ± 0.44 ^{M,H}	0.44 ± 0.65 ^{1,M,H,P}
MEDIUM	0.62 ± 0.31 ^{2,P}	1.09 ± 0.52 ^{1,3,L,P}	0.83 ± 0.45 ^{2,L,P}	MEDIUM	0.38 ± 0.16 ^{3,P}	0.58 ± 0.34 ^{L,P}	0.86 ± 0.53 ^{1,L,P}
HIGH	0.76 ± 0.38 ^{2,L,P}	1.18 ± 0.52 ^{1,3,L,P}	0.78 ± 0.41 ^{2,L,P}	HIGH	0.34 ± 0.48 ^{2,3,P}	0.65 ± 0.67 ^{1,L,P}	0.87 ± 0.51 ^{1,L,P}
PLA	-0.00 ± 0.33 ^{L,M,H}	-0.30 ± 0.50 ^{L,M,H}	-0.42 ± 0.47 ^{L,M,H}	PLA	-0.04 ± 0.13 ^{M,H}	-0.02 ± 0.24 ^{M,H}	0.08 ± 0.17 ^{L,M,H}
PRX/CAF RATIO	1	2	3		1	2	3
LOW	-0.62 ± 0.71	-0.59 ± 0.72	-0.64 ± 0.71	LOW ^P	-0.90 ± 0.98	-0.87 ± 0.97	-0.82 ± 0.96
MEDIUM ^P	-2.94 ± 4.40	-2.92 ± 5.40	-2.92 ± 5.40	MEDIUM ^P	-1.28 ± 2.21	-0.25 ± 2.20	-1.21 ± 2.20
HIGH ^P	-3.66 ± 6.62	-3.63 ± 6.63	-3.65 ± 6.62	HIGH ^P	-1.46 ± 2.05	-1.43 ± 2.06	-1.41 ± 2.05
PLA ^{M,H}	0.88 ± 2.08	0.44 ± 1.32	0.43 ± 0.82	PLA ^{L,M,H}	0.39 ± 0.81	0.58 ± 0.87	0.43 ± 1.27

Data are means with standard deviations; 1,2,3 – change from 0' to 30', from 0' to 60', from 0' to 90' respectively; ^{L,M,H,P} – statistically significant differences of post hoc Bonferroni analysis between doses (L – low, M – medium, H – high dose of caffeine, or P – placebo); ^{1,2,3} – statistically significant differences of post hoc Bonferroni analysis between time-points; CAF – caffeine; PRX – paraxanthine

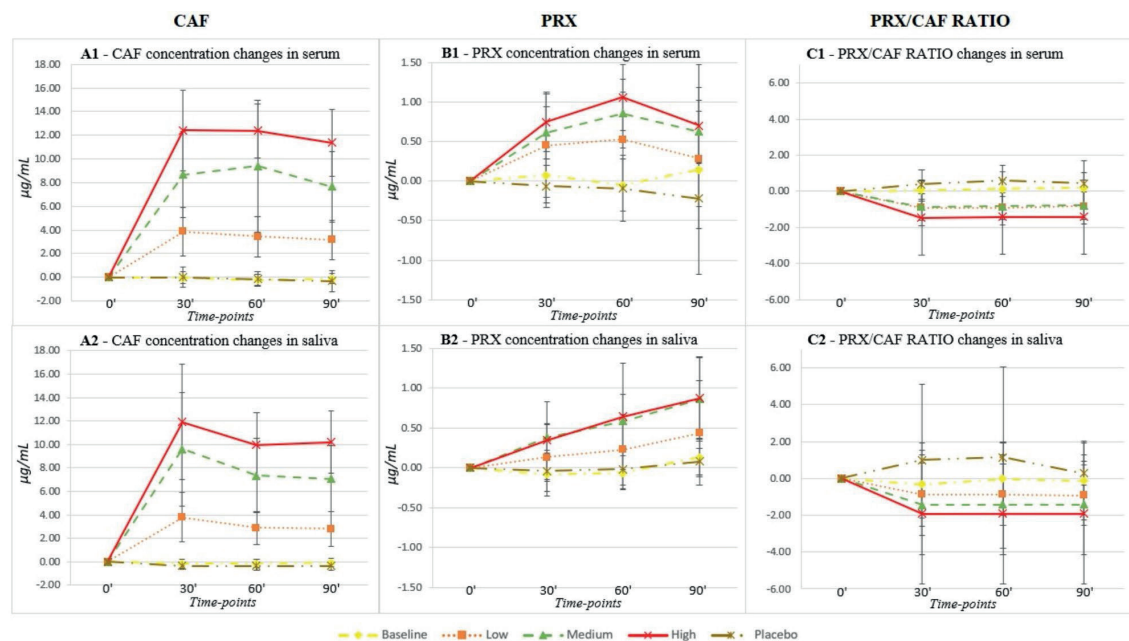


Fig. 3 Changes in CAF and PRX concentrations in serum and saliva. Data are means with standard deviations. A1 – CAF concentration changes in serum; A2 – CAF concentration changes in saliva; B1 – PRX concentration changes in serum; B2 – PRX concentration changes in saliva; C1 – PRX/CAF RATIO changes in serum; C2 – PRX/CAF RATIO changes in saliva

In both the serum and saliva samples, post hoc Bonferroni analysis showed statistical differences ($p < 0.001$) between all the doses and PLA in terms of the D main effect, with the lowest CAF concentration change after PLA, and successively higher after LOW, MED, HIGH doses. A post hoc Bonferroni of the time-point effect on the serum samples revealed significantly higher CAF concentration changes at the 30' vs 90' ($p = 0.040$) and at

the 60' vs 90' time-points ($p = 0.035$); however, the CAF concentrations at the 30' and 60' time-points have been not statistically different ($p > 0.05$). For the time-point main effect of saliva samples, higher CAF concentration changes were detected at the 30' vs 60' ($p < 0.001$) and 90' ($p < 0.001$) time-points; 60' and 90' time-points have been not statistically different ($p > 0.05$) (Table 2; Fig. 3, Supplemental Table S2).

For the PRX variables, GLM analysis revealed a significant effect of the D*TP interaction in both the serum ($p<0.001$) and saliva ($p=0.017$) samples. Pairwise post hoc comparison of the serum D*TP interaction with the Bonferroni test showed higher PRX concentration change at the 60' than at the 90' time-point for the *LOW* ($p=0.015$) dose. At the *MEDIUM* dose, a lower PRX concentration change was observed at the 30' vs 60' ($p=0.018$); however higher change was observed at the 60' vs 90' ($p=0.037$) time-points. With respect to the *HIGH* dose, higher PRX concentration change occurred at 60' than at 30' ($p<0.001$) and 90' ($p<0.001$). All of the doses (*LOW*, *MEDIUM*, and *HIGH*) were characterized by significantly higher PRX concentration changes than in the *PLA* ($p<0.001$) at each time-point. Additionally, at the *LOW* dose in 30', 60' and 90' time-points, the change in the PRX concentration was significantly lower vs *HIGH* ($p<0.001$) dose, and at the 60' and 90' time-points of *MEDIUM* ($p<0.001$). Moreover, pairwise post hoc comparison of the saliva D*TP interaction with the Bonferroni test revealed significantly lower PRX concentration changes at 30' vs 90' for the *LOW* ($p=0.016$) and *MEDIUM* ($p<0.001$) doses and at 30' vs 60' ($p=0.019$) and 90' ($p<0.001$) for the *HIGH* dose. Additionally, at the *LOW* dose at the 60' and 90' time-points, the change in the PRX concentration was lower than that at the *MEDIUM* ($p=0.002$; $p<0.001$) and *HIGH* ($p<0.001$; $p<0.001$) doses. All time-points of *MEDIUM* and *HIGH* doses showed higher PRX concentration change ($p<0.001$) in comparison with all *PLA* time-points. (Table 2; Fig. 3, Supplemental Table S2).

The GLM analysis also revealed significant differences in terms of the D main effect in both the serum ($p=0.009$) and saliva ($p=0.018$) samples in terms of the PRX/CAF RATIO. In the serum, post hoc Bonferroni analysis revealed differences between the *PLA* vs *MEDIUM* ($p=0.018$) and *HIGH* ($p=0.002$) doses in terms of the D main effect, with a decrease in the PRX/CAF RATIO after *MEDIUM* and *HIGH* dose, and an increase after *PLA*. The difference between the *LOW* dose and *PLA* was not significant; however, a decrease in the PRX/CAF RATIO was also observed after the *LOW* dose. Saliva PRX/CAF RATIO variables post hoc Bonferroni analysis revealed differences between the *PLA* vs *LOW* ($p=0.025$), *MEDIUM* ($p=0.002$) and *HIGH* ($p<0.001$) doses in terms of the D main effect, with a decrease in the PRX/CAF RATIO at all doses successively and an increase after *PLA*. In the serum and saliva samples, post hoc Bonferroni analysis of the time-point effect revealed no statistically significant differences (Table 2; Fig. 3, Supplemental Table S2).

CYP1A2 enzyme activity

For the prediction of the PRX/CAF RATIO variables at 6 h after CAF ingestion (CYP1A2 enzyme activity), a GLM showed a statistically significant main effect of D. A post hoc Bonferroni showed differences between the *BASE* vs *LOW* ($p=0.004$), *MEDIUM* ($p<0.001$) and *HIGH* ($p<0.001$) doses and between the *PLA* vs *LOW* ($p<0.001$), *MEDIUM* ($p<0.001$), and *HIGH* ($p<0.001$) doses, with lower variables occurring after CAF supplementation. There were no significant differences between the *LOW*, *MEDIUM* and *HIGH* doses (Table 3, Supplemental Table S1).

All the GLM results are presented in Tables 2 and 3, with additional graphic representation of these results in Fig. 3.

SNP of CYP1A2

There were no significant interactions of the *CYP1A2* genotype with CAF, PRX, or PRX/CAF RATIO in serum or saliva or with CYP1A2 enzyme activity (effects presented in Table 3 and Supplemental Tables S1 and S2).

Discussion

To our knowledge, this is the first study evaluating the effect and differences between three different doses of CAF or *PLA* on the changes in the concentrations of CAF, PRX and PRX/CAF RATIO at different time-points in both the serum and saliva during a study protocol involving moderately trained people, additionally taking into account CYP1A2 enzyme activity and the *CYP1A2* gene. We demonstrated that, in line with our hypothesis, the higher the CAF dose was, the greater the changes in the CAF and PRX concentrations in both the serum and saliva. Nevertheless, contrary to our hypothesis, the peak change in CAF concentration from pre-supplementation was elicited not 60 but 30 min after intake; CYP1A2 enzyme activity was not dose-dependent, and the *CYP1A2* genotype had no interaction with enzyme inducibility.

As mentioned above, in our study, CAF and PRX concentrations were measured in two biological human matrices. We revealed moderate to strong correlations between serum and saliva CAF and PRX concentrations, indicating the possibility of the common use of less invasive saliva sampling under exercise conditions. However, with respect to CAF, the dependent variables (in saliva to serum) were explained in 79% and PRX in 61%. The good correlation observed in the literature between CAF concentrations in serum and saliva indicates that saliva analysis can be efficiently used to reliably reflect CAF concentrations in serum [28]. In a systematic analysis, Grzegorzewski et al. [14] performed linear regressions to quantify the relationships between saliva and blood-based CAF and PRX measurements. The resulting scaling

Table 3 Main, simple and interaction effects on the CAF, PRX and PRX/CAF RATIO variables

SERUM	df	F value	p-value	η_p^2	df	F value	p-value	η_p^2	df	F value	p-value	η_p^2
CAF												
CYP1A2 [C]	1,24	2.27	0.145	0.09	1,24	0.00	0.963	0.00	1,24	1.45	0.241	0.06
Dose [D]	2,23, 53.46	145.00	0.000*	0.86	2,23, 53.46	24.56	0.000*	0.51	1,81, 43.34	5.49	0.009*	0.19
Time-point [TP]	2,48	2.62	0.084	0.10	2,48	11.77	0.000*	0.33	1,08, 25.83	0.40	0.550	0.02
Interaction of dose and time-point [D*TP]	3,19, 76.61	0.55	0.662	0.02	5,31, 127.37	4.70	0.000*	0.16	1,09, 26.18	0.35	0.577	0.01
Interaction of dose and CYP1A2 [D*C]	2,23, 53.46	1.82	0.168	0.07	2,23, 53.46	0.79	0.471	0.03	31,81, 43.34	1.06	0.348	0.04
Interaction of time-point and CYP1A2 [TP*C]	2,48	0.17	0.841	0.01	2,48	0.02	0.985	0.00	1,08, 25.38	0.23	0.656	0.01
Interaction of dose, time-point and CYP1A2 [D*TP*C]	3,19, 76.61	0.04	0.991	0.00	5,31, 127.37	2.18	0.056	0.08	1,09, 26.18	0.24	0.649	0.01
SALIVA												
CAF												
CYP1A2 [C]	1,24	0.32	0.579	0.01	1,24	0.15	0.703	0.01	1,24	0.00	0.947	0.00
Dose [D]	2,72, 65.27	111.78	0.000*	0.82	3,72	16.03	0.000*	0.40	2,43, 58.36	3.96	0.018*	0.14
Time-point [TP]	1,43, 34.23	5.63	0.014*	0.19	2,48	15.10	0.000*	0.39	1,70, 40.75	0.80	0.437	0.03
Interaction of dose and time-point [D*TP]	2,36, 56.64	1.26	0.294	0.05	4,61, 110.57	2.97	0.017*	0.11	1,62, 38.89	1.05	0.346	0.04
Interaction of dose and CYP1A2 [D*C]	2,72, 65.27	0.41	0.727	0.02	3,72	2.32	0.082	0.09	2,43, 58.36	0.66	0.547	0.03
Interaction of time-point and CYP1A2 [TP*C]	1,43, 34.23	1.30	0.277	0.05	2,48	1.63	0.207	0.06	1,70, 40.75	1.12	0.329	0.04
Interaction of dose, time-point and CYP1A2 [D*TP*C]	2,36, 56.64	0.80	0.470	0.03	4,61, 110.57	2.08	0.079	0.08	1,62, 38.69	0.95	0.378	0.04
CYP1A2 enzyme activity												
CAF												
CYP1A2 [C]	1,25	1.75	0.198	0.07								
Dose [D]	1,67, 40.10	12.36	0.000	0.34								
Interaction of dose and CYP1A2 [D*C]	1,67, 40.10	2.81	0.081	0.10								

* - statistical significance $p < 0.05$; C – CYP1A2 genotype; D – dose of CAF (LOW, MEDIUM, HIGH) and PLACEO; TP – measurement time-points (30', 60', 90'); D*TP, D*C, TP*C, D*TP*C – interactions; CAF – caffeine; PRX – paraxanthine; df – degrees of freedom; F value – statistic value of general linear model; p-value – probability variable; η_p^2 – effect size (partial eta square)

factors and Pearson correlation coefficients between saliva to blood-based concentrations of CAF and PRX were 0.79 and 0.68 and 0.84 and 0.76, respectively.

Although current guidelines recommend CAF intake of 3–6 mg_{CAF}/kg_{BM} 30–60 min before the commencement of exercise [7], owing to its effect on the central nervous system, CAF is suspected to be the most ergogenic toward the end of exercise, when perceived effort is increased [29, 30]. Nevertheless, research has shown that after the plasma CAF concentration reaches its peak, it can remain at a steady elevated state even for several hours after intake [31].

Importantly, in contrast to our study, in the majority of research the assessment of CAF or CAF metabolites concentrations was performed solely in serum or plasma (as not the main but rather additional purpose), and blood was taken only at pre-supplementation time-point and one other time-point. Moreover, most exercise studies reported that the concentration of CAF at pre-supplementation time-point after 24 h of abstinence was usually 'zero'; nevertheless, the measured levels may be in fact above zero [32] (ranging from 0.1 to even 5.0 µg/mL [33]). Although the participants were subjected to 24 h of abstinence, similar concentrations were also observed in our study; for this reason, we adopted the method of adjusting the values and assessing the changes in CAF and PRX concentrations from standardized zero levels at the pre-supplementation time-point. Furthermore, it has been shown that major ergogenic effects are unlikely to be induced with doses lower than 3 mg_{CAF}/kg_{BM}, where plasma levels are 2.91–3.88 µg/mL [34]. On the basis of only one previous study [31] analyzing CAF concentrations in plasma at three CAF doses, it was concluded that the *MEDIUM* CAF dose (6 mg_{CAF}/kg_{BM}) may increase CAF plasma levels up to 7.76 µg/mL and that the *HIGH* CAF dose (9 mg_{CAF}/kg_{BM}) up to 11.64–13.58 µg/mL after 60 min of intake. Additionally, it was simultaneously shown that the PRX level did not differ between the 6 and 9 mg_{CAF}/kg_{BM}, suggesting that hepatic CAF metabolism has been already saturated earlier.

Generally, previous studies, including exercise studies, have shown similar values of mean peak CAF concentrations in serum/plasma after CAF intake. The results ranged from 3.90 to 8.19 µg/mL [35–41] for CAF and from 1.08 to 1.60 µg/mL [36, 38, 42] for PRX. Nevertheless, studies have demonstrated that the time to the CAF peak has large inter-individual variations [43, 44]. Moreover, it was speculated that achieving peak serum/plasma concentrations prior to endurance exercise may not be the most important factor in the maximization of CAF ergogenic potential. The other possible explanation may be the CAF concentration at the site of action (in the central nervous system or muscle cells), which is currently impossible to measure. Another possible factor might be

the effect of CAF metabolites or the achievement of peak concentration later in endurance exercise, when fatigue and effort perception are heightened [41].

In our study, the CAF concentration was markedly dependent on the CAF dose (the highest at *HIGH* dose). Interestingly, the peak change occurred at each dose from 0' to 30', and then, the level was maintained until 90', suggesting serum CAF sustainability. This could be recognized as a valuable observation in the scientific and practical background. Simmonds et al. [38] demonstrated that 5 mg_{CAF}/kg_{BM} (in comparison with *PLA*) significantly elevated the CAF plasma concentration after 60 min of intake and improved supramaximal cycling in highly trained male cyclists. In a study by Sampaio-Jorge et al. [39], where recreationally trained male cyclists were supplemented with capsules containing 6 mg_{CAF}/kg_{BM} or *PLA*, significant time and treatment main effects on CAF serum concentrations were observed. However, again, blood samples were taken solely at pre-supplementation time-point and 60 min after the intake of CAF. In a study by Stadheim et al. [40] ten healthy highly trained male cross-country skiers were supplemented with 6 mg_{CAF}/kg_{BM} or *PLA* 75 min before the cross-country performance test (C-PT). Blood samples for CAF concentration analysis were taken more often - at rest, 35 min after ingestion, after the last workload on the incremental test and 1 and 14 min after the performance test. Ingestion of CAF increased plasma concentrations to approximately 7.8 µg/mL before 8-km C-PT, and, similarly to our results, it remained at a similar level throughout the exercise trial [40]. Furthermore, in a study by Mesquita et al. [45] blood samples were collected after the intake of 6 mg_{CAF}/kg_{BM}, immediately after the fatigue protocol and 6 h after intake, and the results demonstrated that the CAF serum concentration increased over time, with a peak level of ~8.51 µg/mL after 60 min of ingestion, which contradicts our results. Nevertheless, it is important to note that in this study, CAF was ingested in the form of capsules, not in powder form, as in our study. Additionally, the serum levels significantly decreased after the "fatigue protocol" (sets of 40 bilateral rebound jumps until task failure) and 6 h later. Bell et al. [46] examined the duration of the CAF ergogenic effect after the ingestion of 5 mg_{CAF}/kg_{BM} and registered significantly elevated CAF plasma concentrations throughout exercise. Nevertheless, this variable remained constant for trials conducted 3 and 6 h after ingestion, and its concentrations determined 1 and 3 h after ingestion were greater than those for the trial conducted 6 h after ingestion. In a more complex study, by Conway et al. [47], 3 or 6 mg_{CAF}/kg_{BM} (capsules) or *PLA* was administered 60 min before exercise, and additionally another 3 mg_{CAF}/kg_{BM} (where the previous dosage was also 3 mg_{CAF}/kg_{BM}) 45 min into exercise was given to the participants. Blood samples

were drawn at pre-supplementation time-point, 30 and 60 min after the first supplementation; and additionally 30, 45, 60, and 90 min after the start of exercise and at the end of exercise (120 min after its onset). Similarly to the current work, CAF plasma concentrations increased in a dose-related manner. Its level was significantly elevated after 30 min but peaked within 90 min in the high-dose group. The lower CAF group exhibited an initial peak after 30 min, which was then followed by a slow decline until the second supplementation. Additionally, the CAF concentration was significantly higher in the higher dose group until 60 min into exercise, when the concentrations were similar [47]. In a study by Skinner et al. [41] 14 cyclists and triathletes consumed 6 mg_{CAF}/kg_{BM} or PLA either 60 min prior to completing a 40 km time trial or when the start of exercise coincided with the individual peak serum CAF concentration, which was determined from a separate 'CAF profiling' session involving monitoring CAF concentrations in the serum every 30 min over a 4 h period. Surprisingly, the CAF peak concentration (~6.4 µg/mL) occurred as late as 120/150 min after intake, but significant performance improvements were noted when CAF was consumed 60 min prior to exercise. It was then concluded that the ergogenic effect of CAF may not be related to the peak CAF concentration in the serum at the onset of endurance exercise. The second study by Skinner et al. [48] showed that the peak CAF serum concentration (~6.79 µg/mL) was also achieved as late as 120–180 min after the ingestion of 6 mg_{CAF}/kg_{BM}. In the third study by Skinner et al. [49] the serum was analyzed for the CAF concentration at 6 time-points over 4 h following 6 or 9 mg_{CAF}/kg_{BM} (fasted vs fed conditions). It was shown that this CAF time to peak occurred 60 min after ingestions for fasted trials compared with 120 and 180 min after ingestions for fed trials (carbohydrate consumption with CAF). Moreover, a higher dose resulted in a greater CAF peak in the fed condition than in the moderate dose in the fasted condition. The authors suspected that if an athlete was to consume a meal within 60 min of exercise, then a higher CAF dose may be needed to achieve the same serum concentrations as a moderate dose taken when fasted. Furthermore, Davenport et al. [30] investigated the optimal timing of a 200 mg CAF-containing supplement on exercise performance [a) 35 min before the 30 min steady-state cycling (SS); b) at the onset of SS, or c) immediately before the 15 min time trial]. Blood samples were taken at five time-points. CAF plasma concentrations increased under all experimental conditions, and there was a significant interaction effect, with peak values observed at different time-points [30]. Although the intake of 1.5–3 mg_{CAF}/kg_{BM} at around 60 min before the cycling time trial may improve performance [50], the same intake at approximately 180 min before the trial does not exhibit

similar results [51]. This finding suggests that elevated plasma CAF may not be the only mechanism responsible for improved performance but rather the optimal timing of the ingestion of a low dose of CAF.

In our study, the CAF dose increased the PRX concentration in the serum, and the change in the PRX concentration was also the greatest with the *HIGH* dose and increased gradually until 60', when its peak was reached. There are only sparse studies measuring PRX concentration after CAF intake. Simmonds et al. [38] demonstrated elevated ($p=0.006$) PRX plasma concentrations after 60 min of 5 mg_{CAF}/kg_{BM} intake in comparison with PLA. Similarly to our results, Conway et al. [47] showed that the PRX plasma concentration was significantly greater in the higher CAF dose group. However, the authors reported that the increase in the PRX concentration occurred at a slower rate, and no peak was observed, as it continued to increase throughout exercise [47]. Additionally, the PRX concentrations were greater with higher CAF intake and under fasted conditions. The authors suspected that if PRX contributes to the ergogenic CAF potential, the reduced PRX concentration observed following a pre-exercise meal may even limit the ability of CAF to enhance performance [49]. Davenport et al. [30] reported that PRX plasma concentrations increased over the duration of the trial and that there was a main effect for condition, with PRX concentrations being higher at the CAF intake point of 35 min before exercise. Interestingly, although CAF was elevated before and during the exercise test with all strategies, PRX was elevated only prior to exercise when the supplement was ingested 35 min before exercise (the most currently postulated strategy with ergogenic effects) [30].

In terms of saliva measurements, our study revealed that the change in the CAF concentration in saliva was also the greatest in *HIGH* dose. The peak change occurred from 0' to 30'; nevertheless, in contrast to serum, we observed further significant differences between time-points, which suggested lower sustainability in saliva, which was probably influenced by other factors. Furthermore, the CAF dose increased the PRX concentration in the serum, and the change in the PRX concentration in the serum was also the greatest in *HIGH* dose. The saliva PRX peak was not achieved at the 60' time-point for each dose, but increased gradually at least until the 90' time-point. In another study, measuring saliva, Zawieja et al. [23] collected saliva samples at pre-supplementation time-point, 45 min post-ingestion of 5 mg_{CAF}/kg_{BM} and post-exercise (120 min post-ingestion) to quantify the CAF and PRX concentrations. The CAF concentration increased 30-fold and was approximately 20 times greater than that during the PLA trial at 45 min post-ingestion and decreased post-exercise. In

turn, the PRX concentration increased 2.5 times 45 min post-ingestion and then increased further to the next time-point.

Notably, in our study, serum CAF concentration changes did not differ significantly between the 30' and 60' time-point, suggesting the possibility of attaining an earlier plateau, causing a peak in CAF was achieved before exercise. Davenport et al. [30] observed this at approximately 50 min after CAF ingestion, which is in contrast with other studies showing peak CAF concentrations between 75 and 120 min post supplementation [4, 47, 52]. Interestingly, it has been suggested that performance improvements caused by a reduction in perceived exertion may be mediated not only by CAF but also by increased PRX concentrations [30]. It may be concluded that when the plasma CAF concentration decreases, the PRX concentration may still increase, with no indication of a plateau even after 180 min [47]. Its increase in plasma occurs at a slower rate than that of CAF during the period of 60 min [32].

Additionally, we measured CYP1A2 enzyme activity via the mean time-corrected PRX/CAF RATIO in saliva and demonstrated that there was no CAF dose-dependency. Previously, a number of different biological human matrices and metrics, such as urine, plasma, serum, and saliva, have been employed, and CAF has been used as a probe for measuring CYP1A2 enzyme activity. The PRX/CAF concentration ratio at a single time-point correlates with apparent CAF clearance [12]. Metabolic phenotyping with PRX/CAF RATIO is time dependent (ratios increasing with time) and there is a clear CAF-dose dependency (smaller CAF doses increase the metabolic ratio) [14]. Although, it was demonstrated that to reliably assess CYP1A2 enzyme activity, no 24 h CAF abstinence is needed [12], in our study, this abstinence was followed by participants. The 'gold standard' for CYP1A2 enzyme activity estimation is considered to be the saliva molar PRX/CAF RATIO 6 h after CAF intake, owing to its best correlation with intrinsic CAF/PRX clearance [8, 24]. On the basis of these data, Urry et al. [8] developed a method enabling the adjustment of the CYP1A2 enzyme activity values to the optimal values and required 6 h post-dose sampling time-point. This novel technique accounts for the varied time intervals between CAF intake and saliva sampling. Perera et al. [12] quantified plasma and saliva CAF concentrations at different time-points after the ingestion of 100 mg of CAF. No significant difference was found between the PRX/CAF AUC_{0–24} ratio in plasma (0.79) and saliva (0.78) during the CAF abstinence period and during no abstinence (0.83 and 0.85, respectively). In particular, the PRX/CAF RATIO at 4 h demonstrated a strong correlation with all the reference metrics, such as CAF clearance or plasma CAF/PRX. Moreover, a study conducted in healthy males and females [53] assessing

CAF as a probe for CYP1A2 enzyme activity reported no evidence of dose dependency. It was also concluded that even with high CAF consumption, steady-state concentrations are too low to saturate CYP1A2-mediated metabolism [13]. Considering the habitual intake of coffee, people who usually drink more than three cups/day usually have significantly higher normal CYP1A2 enzyme activity than individuals who usually consume less. This finding suggests that cessation of regular CAF intake before the measurement of CYP1A2 activity may have resulted in its decrease during the study; thus, it may not reflect an individual's usual CYP1A2 activity [13].

In our study, the functional rs762551 polymorphism of the *CYP1A2* gene was analyzed, but no interaction with CYP1A2 enzyme activity was found. It is a demonstrated determinant of inducible CYP1A2 activity, by which genotypes may be labeled 'highly inducible' (AA) and 'less inducible' (AC, CC) [8, 54]. On the basis of the literature, AA homozygotes may metabolize CAF more quickly and perceive a greater ergogenic effect [55]. In this case, it would appear that PRX may be a more potent adenosine-receptor antagonist, which is elevated sooner in the AA genotype [30]. Nevertheless, several authors [8, 56–59] have demonstrated that there is no significant effect of this SNP on CYP1A2 enzyme activity, as measured by the PRX/CAF RATIO or the mean time-corrected PRX/CAF RATIO, indicating that this *CYP1A2* genotype is not a robust predictor of the CYP1A2 phenotype. The –163 C>A polymorphism is correlated with RATIO only in smokers [58], since the more pronounced increase in CYP1A2 enzyme activity caused by this genetic variation is only observed in current smokers. Smokers with the –163 C/C genotype have been shown to have 40% lower plasma PRX/CAF RATIO than those with the –163 A/A genotype, while no influence of this polymorphism has been detected among nonsmokers [57]. Interestingly, according to Davenport et al. [30] although regular exercise increases *CYP1A2* expression, it seems that 'slow metabolizers' may be able to overcome any genetic disadvantage with training to increase CYP1A2 enzyme activity sufficiently.

Limitations

Notably, our research has several limitations. Firstly, we examined the CAF and PRX concentrations at different time-points over a relatively short period of time (0–90 min); the sampling was not constant over a long period of time, which prevented us from measuring the AUC, and we were not able to measure the possible peak of PRX, as it is believed to peak further than 90 min. Secondly, examining the PRX/CAF RATIO only at these time-points probably influenced the possibility of adequate CYP1A2 enzyme activity measurement. It is established that early and late time-sampling are least suitable

for phenotyping because at these time-points, concentrations may be low, resulting in relatively high random errors and thus a low single to noise ratio. Additionally, in this early stage, the distribution phase of the substance and its absorption and kinetics may further influence the outcome of metabolic ratios. Moreover, metabolic phenotyping with PRX/CAF RATIO is strongly time dependent (the ratio increases with time), and smaller CAF doses and concentrations increase the metabolic ratio (explaining why *BASE* and *PLA* values were profoundly higher) [8, 14, 32]. Nevertheless, as we were aware of this methodological issue, we used a previously developed method to adjust the CYP1A2 enzyme activity to the optimal 6 h after CAF administration sampling [8]. Moreover, the *CYP1A2* genotypes results should be accounted with caution due to relatively small sample of 'fast metabolizers' among the studied participants. Nevertheless, in accordance with the Hardy-Weinberg principle, the frequency of *CYP1A2* SNP in the population is approximately 45% for AAs, 45% for ACs and 10% for CCs [9]. Finally, although we included both males and females in the study protocol, because of the participation of both sexes in CrossFit/HIFT training, we were not able to perform sex-dependent analyses differentiating CAF effects between sexes (uneven groups).

Strengths

The unquestionable strengths of our study were its multiple crossover design protocol and the implementation of three different CAF doses, as well as the *PLA*, in HIFT-trained participants. Secondly, as the first study, we analyzed both serum and saliva CAF and PRX concentrations at different time-points in moderately trained people and measured their CYP1A2 enzyme activity. Thirdly, taking into account the possibility of higher than zero CAF pre-supplementation concentrations, we assessed the effects of CAF on CAF and PRX changes from the pre-supplementation time-point. Furthermore, we used a saliva to serum regression model, which to some extent accounted for changes in CAF or PRX concentrations with time in saliva (concentrations decreased over time) and serum (more constant). In addition, we calculated the required sample size, which was met by the number of participants who took part in the study. Furthermore, all study participants were habitual CAF users who maintained 24 h CAF abstinence and were not smokers. We also ensured full compliance with the intake of supplements and thorough standardization of the procedures.

Conclusions

In conclusion, the present study confirmed the dose- and time-point-dependent effects of CAF supplementation on CAF and PRX concentrations in the serum and saliva of HIFT-trained participants. Furthermore, the peak

change in CAF concentration was elicited 30 min after intake, suggesting discrepancies from current CAF supplementation recommendations. Additionally, the earlier CAF plateau and possible late PRX plateau obtained in this study may be important scientific and practical indicators. Nevertheless, there was no evidence of a CAF dose effect on CYP1A2 enzyme activity, nor was there an interaction of the *CYP1A2* genotype with enzyme inducibility. Finally, a correlation between serum and saliva CAF and PRX concentrations was observed, indicating the possibility of common, interchangeable use of less invasive saliva sampling in exercise studies. Future studies should focus on common measurements of CAF and its metabolites in relation to performance and the possibility of achieving peak concentrations later in exercise, when fatigue occurs.

Practical implications

Our research on CAF supplementation in athletes highlights several key practical implications for sports nutrition. Firstly, our results demonstrating peak CAF levels occurring around 30 min post-ingestion may possibly shorten the recommended timing of CAF intake prior to exercise. Moreover, the revealed sustained elevated CAF levels for up to 90 min suggest prolonged ergogenic benefits during exercise. Additionally, while CAF's central nervous system effects are likely most beneficial toward the later stages of exercise when fatigue and perceived effort increase, our study suggests that the ergogenic benefits may not be strictly tied to peak CAF concentrations at the start of exercise. Secondly, our study also emphasizes the relevance of PRX, which continues to increase in concentration even after CAF begins to decline, peaking much later. This delayed increase in PRX might contribute to performance improvements, particularly in reducing perceived exertion toward the end of prolonged activities. Furthermore, the moderate to strong correlation between serum and saliva concentrations of both CAF and PRX indicates that saliva sampling could serve as a less invasive and practical alternative for monitoring these compounds in athletic settings. This nuanced understandings offers athletes and coaches insights into optimizing CAF intake for exercise performance.

Abbreviations

1 st	Pre-supplementation (0')
2 nd	30 min after supplementation (30')
3 rd	60 min after supplementation (60'), pre-exercise
4 th	3 min after exercise (90 min after supplementation, 90')
BASE, B	Baseline
BM	Body mass
CAF	Caffeine
HIFT	High-intensity functional training
HIGH, H	9 mg _{CAF} /kg _{BM}
LOW, L	3 mg _{CAF} /kg _{BM}
MEDIUM, M	6 mg _{CAF} /kg _{BM}
PLA, P	Placebo

PRX	Paraxanthine
PRX/CAF RATIO	Paraxanthine to caffeine ratio
SD	Standard deviation
SNP	Single nucleotide polymorphism
T ₀ –T ₄	Order of study visits

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s12986-024-00863-3>.

Supplementary Material 1

Supplementary Material 2

Supplementary Material 3

Acknowledgements

Not applicable.

Author contributions

Study design/planning: N.G., K.D.-M.; data collection/entry: N.G., J.M., J.A., E.E.Z., A.C., K.D.-M.; data analysis/statistics: N.G., J.M.; data interpretation: N.G., J.M., K.D.-M.; preparation of the first draft version of the manuscript: N.G., J.M., K.D.-M.; literature analysis/search: N.G.; collection of funds: N.G., K.D.-M. All authors were involved in drafting versions and critically revising for important intellectual content. All authors have contributed to and approved the final version of the manuscript.

Funding

This work was supported by own resources of the Department of Sports Dietetics.

Data availability

No datasets were generated or analysed during the current study.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

The study was approved by the Bioethics Committee at Poznan University of Medical Sciences (reference number 293/17 of May 11, 2017). All participants gave written informed consent for participation in the study.

Consent for publication

All authors support the submission to this journal.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Author details

¹Department of Sports Dietetics, Poznan University of Physical Education, Poznań 61-871, Poland

²Department of Pedagogy, Poznan University of Physical Education, Poznań, Poland

³Department of Human Nutrition and Dietetics, Poznań University of Life Sciences, Poznań, Poland

⁴Sport Sciences–Biomedical Department, Faculty of Physical Education and Sport, Charles University, Prague, Czech Republic

Received: 2 September 2024 / Accepted: 25 October 2024

Published online: 11 November 2024

References

- Nehlig A. Interindividual differences in caffeine metabolism and factors driving caffeine consumption. *Pharmacol Rev.* 2018;70:384–411.
- Arnaud MJ. Pharmacokinetics and metabolism of natural methylxanthines in animal and man. *Handb Exp Pharmacol.* 2011;33–91.

- Reddy VS, Shiva S, Manikantan S, et al. Pharmacology of caffeine and its effects on the human body. *Eur J Med Chem Rep.* 2024;10:100138.
- Kamimori GH, Karyekar CS, Otterstetter R, et al. The rate of absorption and relative bioavailability of caffeine administered in chewing gum versus capsules to normal healthy volunteers. *Int J Pharm.* 2002;234:159–67.
- Wickham KA, Spriet LL. Administration of caffeine in alternate forms. *Sports Med.* 2018;48:79–91.
- Grgic J. Effects of caffeine on resistance exercise: a review of recent research. *Sports Med.* 2021;51:2281–98.
- Guest NS, VanDusseldorp TA, Nelson MT, et al. International society of sports nutrition position stand: caffeine and exercise performance. *J Int Soc Sports Nutr.* 2021;18:1.
- Urry E, Jetter A, Landolt H-P. Assessment of CYP1A2 enzyme activity in relation to type-2 diabetes and habitual caffeine intake. *Nutr Metab.* 2016;13:66.
- Saunders B, da Costa LR, de Souza RAS, Barreto G, Marticorena FM. Caffeine and sport. *Adv Food Nutr Res.* 2023;106:95–127.
- van Doude LAJE, Koopmans RP, Guchelaar H-J. Two novel methods for the determination of CYP1A2 activity using the paraxanthine/caffeine ratio. *Fundam Clin Pharmacol.* 2003;17:355–62.
- Perera V, Gross AS, McLachlan AJ. Caffeine and paraxanthine HPLC assay for CYP1A2 phenotype assessment using saliva and plasma. *Biom Chromatogr.* 2010;24:1136–44.
- Perera V, Gross AS, Xu H, McLachlan AJ. Pharmacokinetics of caffeine in plasma and saliva, and the influence of caffeine abstinence on CYP1A2 metrics. *J Pharm Pharmacol.* 2011;63:1161–8.
- Perera V, Gross AS, McLachlan AJ. Measurement of CYP1A2 activity: a focus on caffeine as a probe. *Curr Drug Metab.* 2012;13:667–78.
- Grzegorzewski J, Bartsch F, Köller A, König M. Pharmacokinetics of caffeine: a systematic analysis of reported data for application in metabolic phenotyping and liver function testing. *Front Pharmacol.* 2022;12:752826.
- Durkalec-Michalski K, Kamińska J, Saunders B, Pokrywka A, Łoniewski I, Steffl M, Podgórski T. Does sodium bicarbonate based extra-cellular buffering support reduce high intensity exercise-induced fatigue and enhance short-term recovery assessed by selected blood biochemical indices? *Biol Sport.* 2023;41:17–27.
- Durkalec-Michalski K, Domagałski A, Główka N, Kamińska J, Szymczak D, Podgórski T. Effect of a four-week vegan diet on performance, training efficiency and blood biochemical indices in crossfit-trained participants. *Nutrients.* 2022;14:894.
- Magkos F, Kavouras SA. Caffeine use in sports, pharmacokinetics in man, and cellular mechanisms of action. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2005;45:535–62.
- Nieber K. The impact of coffee on health. *Planta Med.* 2017;83:1256–63.
- Główka N, Malik J, Podgórski T, Stemplewski R, Maciaszek J, Ciążyńska J, Zawieja EE, Chmurzynska A, Nowaczyk PM, Durkalec-Michalski K. The dose-dependent effect of caffeine supplementation on performance, reaction time and postural stability in CrossFit - a randomized placebo-controlled crossover trial. *J Int Soc Sports Nutr.* 2024;21:2301384.
- Durkalec-Michalski K, Zawieja EE, Zawieja BE, Podgórski T. Evaluation of the repeatability and reliability of the cross-training specific Fight Gone Bad workout and its relation to aerobic fitness. *Sci Rep.* 2021;11:7263.
- Durkalec-Michalski K, Nowaczyk PM, Główka N, Grygiel A. Dose-dependent effect of caffeine supplementation on judo-specific performance and training activity: a randomized placebo-controlled crossover trial. *J Int Soc Sports Nutr.* 2019;16:38.
- Durkalec-Michalski K, Zawieja EE, Podgórski T, Łoniewski I, Zawieja BE, Warzybok M, Jeszka J. The effect of chronic progressive-dose sodium bicarbonate ingestion on CrossFit-like performance: A double-blind, randomized crossover trial. *PLoS ONE.* 2018;13:e0197480.
- Zawieja E, Chmurzynska A, Aniola J, Zawieja BE, Cholewa J. The effect of caffeine supplementation on resistance and jumping exercise: the interaction with CYP1A2 and ADORA2A genotypes. *Nutraceuticals.* 2023;3:274–89.
- Fuhr U, Rost KL, Engelhardt R, Sachs M, Liermann D, Belloc C, Beaune P, Janecz S, Grant D, Meyer UA, Staib AH. Evaluation of caffeine as a test drug for CYP1A2, NAT2 and CYP2E1 phenotyping in man by in vivo versus in vitro correlations. *Pharmacogenetics.* 1996;6:159–76.
- Fuhr U, Rost KL. Simple and reliable CYP1A2 phenotyping by the paraxanthine/caffeine ratio in plasma and in saliva. *Pharmacogenetics.* 1994;4:109–16.
- Spigset O, Hägg S, Söderström E, Dahlqvist R. The paraxanthine:caffeine ratio in serum or in saliva as a measure of CYP1A2 activity: when should the sample be obtained? *Pharmacogenetics.* 1999;9:409–12.

27. Grgic J, Grgic I, Pickering C, et al. Wake up and smell the coffee: caffeine supplementation and exercise performance—an umbrella review of 21 published meta-analyses. *Br J Sports Med*. 2020;54:681–8.
28. Scott NR, Chakraborty J, Marks V. Determination of caffeine, theophylline and theobromine in serum and saliva using high-performance liquid chromatography. *Ann Clin Biochem*. 1984;21(Pt 2):120–4.
29. Southward K, Rutherford-Markwick KJ, Ali A. The effect of acute caffeine ingestion on endurance performance: a systematic review and meta-analysis. *Sports Med*. 2018;48:1913–28.
30. Davenport AD, Jameson TSO, Kilroe SP, Monteyne AJ, Pavis GF, Wall BT, Dirks ML, Alamdari N, Miks CR, Stephens FB. A randomised, placebo-controlled, crossover study investigating the optimal timing of a caffeine-containing supplement for exercise performance. *Sports Med Open*. 2020;6:17.
31. Graham TE, Spriet LL. Metabolic, catecholamine, and exercise performance responses to various doses of caffeine. *J Appl Physiol*. 1995;78:867–74.
32. Lajin B, Schweighofer N, Goessler W, Obermayer-Pietsch B. The determination of the Paraxanthine/Caffeine ratio as a metabolic biomarker for CYP1A2 activity in various human matrices by UHPLC-ESI/MS. *Talanta*. 2021;234:122658.
33. Jacobson AF, Cerqueira MD, Raisys V, Shattuc S. Serum caffeine levels after 24 hours of caffeine abstinence: observations on clinical patients undergoing myocardial perfusion imaging with dipyridamole or adenosine. *Eur J Nucl Med*. 1994;21:23–6.
34. Spriet LL. Exercise and sport performance with low doses of caffeine. *Sports Med*. 2014;44(Suppl 2):S175–184.
35. Blanchard J, Sawers SJ. Comparative pharmacokinetics of caffeine in young and elderly men. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1983;11:109–26.
36. Benowitz NL, Jacob P III, Mayan H, Denaro C. Sympathomimetic effects of paraxanthine and caffeine in humans. *Clin Pharmacol Ther*. 1995;58:684–91.
37. Collomp K, Anselme F, Audran M, Gay JP, Chanal JL, Prefaut C. Effects of moderate exercise on the pharmacokinetics of caffeine. *Eur J Clin Pharmacol*. 1991;40:279–82.
38. Simmonds MJ, Minahan CL, Sabapathy S. Caffeine improves supramaximal cycling but not the rate of anaerobic energy release. *Eur J Appl Physiol*. 2010;109:287–95.
39. Sampaio-Jorge F, Morales AP, Pereira R, Barth T, Ribeiro BG. Caffeine increases performance and leads to a cardioprotective effect during intense exercise in cyclists. *Sci Rep*. 2021;11:24327.
40. Stadheim HK, Kvamme B, Olsen R, Drevon CA, Ivy JL, Jensen J. Caffeine increases performance in cross-country double-pole time trial exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 2013;45:2175–83.
41. Skinner TL, Jenkins DG, Taaffe DR, Leveritt MD, Coombes JS. Coinciding exercise with peak serum caffeine does not improve cycling performance. *J Sci Med Sport*. 2013;16(1):54–9.
42. Hetzler RK, Knowlton RG, Somani SM, Brown DD, Perkins RM 3rd. Effect of paraxanthine on FFA mobilization after intravenous caffeine administration in humans. *J Appl Physiol* (1985). 1990;68(1):44–7.
43. Desbrow B, Barrett CM, Minahan CL, Grant GD, Leveritt MD. Caffeine, cycling performance, and exogenous CHO oxidation: a dose-response study. *Med Sci Sports Exerc*. 2009;41(9):1744–51.
44. Robertson D, Frölich JC, Carr RK, Watson JT, Hollifield JW, Shand DG, Oates JA. Effects of caffeine on plasma renin activity, catecholamines and blood pressure. *N Engl J Med*. 1978;26(4):181–6.
45. Mesquita RNO, Cronin NJ, Kyröläinen H, Hintikka J, Avela J. Effects of caffeine on neuromuscular function in a non-fatigued state and during fatiguing exercise. *Exp Physiol*. 2020;105(4):690–706.
46. Bell DG, McLellan TM. Exercise endurance 1, 3, and 6 h after caffeine ingestion in caffeine users and nonusers. *J Appl Physiol*. 2002;93:1227–34.
47. Conway KJ, Orr R, Stannard SR. Effect of a divided caffeine dose on endurance cycling performance, postexercise urinary caffeine concentration, and plasma paraxanthine. *J Appl Physiol* (1985). 2003;94:1557–62.
48. Skinner TL, Jenkins DG, Leveritt MD, McGorm A, Bolam KA, Coombes JS, Taaffe DR. Factors influencing serum caffeine concentrations following caffeine ingestion. *J Sci Med Sport*. 2014;17(5):516–20.
49. Skinner TL, Jenkins DG, Folling J, Leveritt MD, Coombes JS, Taaffe DR. Influence of carbohydrate on serum caffeine concentrations following caffeine ingestion. *J Sci Med Sport*. 2013;16(4):343–7.
50. Talanian JL, Spriet LL. Low and moderate doses of caffeine late in exercise improve performance in trained cyclists. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2016;41:850–5.
51. Desbrow B, Leveritt M. Awareness and use of caffeine by athletes competing at the 2005 Ironman Triathlon World Championships. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*. 2006;16:545–58.
52. Kovacs EM, Stegen JHCH, Brouns F. Effect of caffeinated drinks on substrate metabolism, caffeine excretion, and performance. *J Appl Physiol* (1985). 1998;85:709–15.
53. Nordmark A, Lundgren S, Cnattingius S, Rane A. Dietary caffeine as a probe agent for assessment of cytochrome P4501A2 activity in random urine samples. *Br J Clin Pharmacol*. 1999;47(4):397–402.
54. Han XM, Ou-Yang DS, Lu PX, Jiang CH, Shu Y, Chen XP, Tan ZR, Zhou HH. Plasma caffeine metabolite ratio (17X/137X) in vivo associated with G-2964A and C734A polymorphisms of human CYP1A2. *Pharmacogenetics*. 2001;11(5):429–35.
55. Guest N, Corey P, Vescovi J, El-Sohemy A. Caffeine. CYP1A2 genotype, and endurance performance in athletes. *Med Sci Sports Exerc*. 2018;50(8):1570–8.
56. Dobrinas M, Cornuz J, Oneda B, Kohler Serra M, Puhl M, Eap CB. Impact of smoking, smoking cessation, and genetic polymorphisms on CYP1A2 activity and inducibility. *Clin Pharmacol Ther*. 2011;90(1):117–25.
57. Gunes A, Dahl M-L. Variation in CYP1A2 activity and its clinical implications: influence of environmental factors and genetic polymorphisms. *Pharmacogenomics*. 2008;9:625–37.
58. Gunes A, Ozbey G, Vural EH, Uluoglu C, Scordo MG, Zengil H, Dahl ML. Influence of genetic polymorphisms, smoking, gender and age on CYP1A2 activity in a Turkish population. *Pharmacogenomics*. 2009;10(5):769–78.
59. Tian DD, Natesan S, White JR, Paine J. Effects of Common CYP1A2 Genotypes and Other Key Factors on Intraindividual Variation in the Caffeine Metabolic Ratio: An Exploratory Analysis. *Clin Transl Sci*. 2019;12(1):39–46.

Publisher's note

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

