AKADEMIA KULTURY FIZYCZNEJ

im. Bronisława Czecha w Krakowie

Szkoła Doktorska

mgr Adrianna Dzidek

Rozprawa doktorska

Wpływ zabiegów krioterapii ogólnoustrojowej na cechy skóry i profil wybranych adipokin i sirtuin u osób z różnym stopniem otłuszczenia organizmu

Promotor:

dr hab. Anna Kurkiewicz-Piotrowska, prof. AKF

Promotor pomocniczy:

dr Olga Czerwińska-Ledwig

Kraków, 2026

Ze szczególną wdzięcznością i szacunkiem wspominam ***prof. dr hab. Wandę Pilch,*** *moją Panią Promotor, od której rozpoczęła się niniejsza ścieżka naukowa. Dziękuję za cenne wskazówki, inspiracje oraz stworzenie fundamentów, na bazie których powstała ta dysertacja.*

PODZIĘKOWANIA

Słowa wdzięczności kieruję do mojej Pani Promotor, ***dr. hab. Anny Kurkiewicz-Piotrowskiej****,* ***prof. AKF****, za poświęcony mi czas, cenne wskazówki oraz nieocenioną pomoc na każdym etapie tworzenia niniejszej pracy. Pani wiedza, zaangażowanie i zaufanie były dla mnie ogromnym wsparciem i pozwoliły mi na rozwijanie naukowych pasji.*

***

Serdeczne podziękowania kieruję do mojej Pani Promotor Pomocniczej, ***dr Olgi Czerwińskiej-Ledwig****, za całe okazane mi wsparcie naukowe oraz cenne uwagi do niniejszej pracy. Dziękuję za życzliwość i cierpliwość podczas nauki analiz biochemicznych.*

***

Pragnę podziękować również ***współpracowniczkom*** *z Zakładu Chemii i Biochemii za okazaną życzliwość i pomoc w przeprowadzeniu badań stanowiących podstawę niniejszej dysertacji.*

***

Serdeczne podziękowania składam mojemu narzeczonemu ***Przemkowi.*** *Twoja miłość, cierpliwość i świadomość, że zawsze mogę na Tobie polegać były dla mnie nieocenionym wsparciem.*

***

Najserdeczniejsze podziękowania kieruję do moich ukochanych ***Rodziców****, na których wsparcie zawsze mogę liczyć, zarówno w życiu prywatnym, zawodowym jak i naukowym.*

***

Dziękuję pozostałym członkom rodziny i przyjaciołom, którzy wspierali mnie na każdym etapie naukowej drogi, wierząc we mnie i motywując mnie do dalszego działania.

***

Na koniec, chciałabym serdecznie podziękować ***Ochotnikom*** *niniejszych badań.*
To dzięki Wam ta praca powstała.

Spis treści

WYKAZ SKRÓTÓW **5**

SPIS PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD CYKLU DYSERTACYJNEGO **6**

1. WSTĘP **8**

2. CEL PRACY, PYTANIA ORAZ HIPOTEZY BADAWCZE **13**

2.1. CEL PRACY 13
2.2. PYTANIA BADAWCZE 13
2.3. HIPOTEZY BADAWCZE 14

3. MATERIAŁ I METODY BADAWCZE **15**

3.1. PROTOKÓŁ BADANIA 15
3.2. MATERIAŁ 17
3.2.1. Grupa badana *17*
3.3. METODY BADAWCZE 19
3.3.1. Pomiary antropometryczne *19*
3.3.2. Pomiary wybranych cech skóry *19*
3.3.3. Pobieranie krwi i ocena stężeń parametrów biochemicznych *20*
3.3.4. Zabiegi WBC *20*
3.3.5. Analiza statystyczna *21*

4. NAJWAŻNIEJSZE WYNIKI **22**

4.1. CHARAKTERYSTYKA GRUP 22
4.2. ZMIANY CECH SKÓRY 22
4.3. WPŁYW WBC NA CECHY ANTROPOMETRYCZNE 28
4.4. ZMIANY W STĘŻENIACH WYBRANYCH ADIPOKIN 29
4.5. ZMIANY W STĘŻENIACH WYBRANYCH SIRTUINY 31
4.6. ZMIANY W METABOLIZMIE WĘGLOWODANÓW 33

5. DYSKUSJA **38**

6. WNIOSKI **46**

7. PIŚMIENNICTWO **49**

ANEKS **62**

PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD CYKLU DYSERTACYJNEGO 62
Publikacja nr 1 The Use of Cryotherapy in Cosmetology and the Influence of Cryogenic Temperatures on Selected Skin Parameters-A Review of the Literature *62*
Publikacja nr 2 The Role of Increased Expression of Sirtuin 6 in the Prevention of Premature Aging Pathomechanisms *73*
Publikacja nr 3 Leptyna w otyłości - możliwości terapeutyczne *88*
Publikacja nr 4 Use of Measurement Probes to Evaluate the Effect of a Series of Whole-Body Cryostimulation Treatments on Skin Characteristics in Subjects with Different BMIs *98*
Publikacja nr 5 Effect of a series of whole-body cryostimulation treatments on vaspin levels in subjects with different body mass indexes *115*
Publikacja nr 6 The effect of whole-body cryostimulation treatments on the profile of selected adipokines and sirtuins in middle-aged individuals with varying degrees of body fatness *122*
OŚWIADCZENIA AUTORÓW 133
ZGODA KOMISJI BIOETYCZNEJ 161

STRESZCZENIE **162**

ABSTRACT **163**

Wykaz skrótów

ADP – *ang. adiponectin* – adiponektyna

ANOVA – *ang. analysis of variance* – analiza wariancji

ANZCTR – *ang. Australian New Zealand Clinical Trials Registry* – Australijsko-nowozelandzki rejestr badań klinicznych

ASP – *ang. asprosin* – asprozyna

BAT – *ang. brown adipose tissue* – brązowa tkanka tłuszczowa

BMI – *ang. body mass index* – wskaźnik masy ciała

CG – *ang. control group* – grupa kontrolna

CLNB – Centralne Laboratorium Naukowo-Badawcze

ELISA – *ang. enzyme-linked immunosorbent assay* – test immunoenzymatyczny

FBG – *ang. fasting blood glucose* – glukoza na czczo

HbA1c – hemoglobina glikozylowana A1c

HOMA-IR – *ang. homeostasis model assessment of insulin resistance* - model homeostazy do oceny insulinooporności

LEP – *ang. leptin* – leptyna

MPA – *ang. Multi Probe Adapter* – adapter wielosondowy

QUICKI – *ang. quantitative insulin sensitivity check index* – indeks ilościowej oceny wrażliwości na insulinę

RETN – *ang. resistin* – rezystyna

SG – *ang. study group* – grupa badana

SIRT – *ang. sirtuin* – sirtuina

STAT3 – *ang. Signal Transducer and Activator of Transcription 3* – przekaźnik sygnału i aktywator transkrypcji 3

TAS – *ang. Total Antioxidant Status* – całkowita zdolność antyoksydacyjna osocza

TEWL – *ang. transepidermal water loss* – transepidermalna ucieczka wody

VASP – *ang. vaspin* - waspina

WAT – *ang. white adipose tissue* – biała tkanka tłuszczowa

WBC – *ang. whole body cryotherapy/cryostimulation* – krioterapia/kriostymulacja ogólnoustrojowa

WHO – *ang. World Health Organization* – Światowa Organizacja Zdrowia

WHR – *ang. waist-to-hip ratio* – stosunek obwodu talii do bioder

WHtR – *ang. waist-to-height ratio* – stosunek obwodu talii do wysokości ciała

Spis publikacji wchodzących w skład cyklu dysertacyjnego

Przedstawiona rozprawa doktorska została przygotowana w formie cyklu sześciu publikacji naukowych, które są ze sobą powiązane tematycznie. Zostały one opublikowane w czasopismach spełniających wymogi Ustawy o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 ze zm.). Jestem pierwszą autorką tych prac i mam wiodący wkład w ich powstaniu. Brałam istotny udział w projektowaniu, organizacji i przeprowadzeniu badań, a także w tworzeniu wszystkich rozdziałów publikacji dysertacyjnych na każdym etapie procesu ich publikowania. W Aneksie zamieszczono kompletne manuskrypty wraz z przygotowanymi do nich suplementami oraz oświadczenia o wkładzie pracy poszczególnych autorów, włożonym w przygotowanie danej publikacji.

Seria publikacji naukowych niniejszej rozprawy obejmuje następujące artykuły:

Publikacja nr 1:

Dzidek, A.; Piotrowska, A. *The Use of Cryotherapy in Cosmetology and the Influence of Cryogenic Temperatures on Selected Skin Parameters-A Review of the Literature*. Cosmetics 2022;9:100. doi: 10.3390/cosmetics9050100

- Punktacja MNiSW: 20; Impact Factor: 3,3

Publikacja nr 2:

Dzidek, A.; Czerwińska-Ledwig, O.; Żychowska, M.; Pilch, W.; Piotrowska, A. *The Role of Increased Expression of Sirtuin 6 in the Prevention of Premature Aging Pathomechanisms.* Int J Mol Sci. 2023;24(11):9655. doi: 10.3390/ijms24119655.

- Punktacja MNiSW: 140; Impact Factor: 4,9

Publikacja nr 3:

Dzidek, A.; Piotrowska, A. *Leptyna w otyłości - możliwości terapeutyczne*. In book: Fizjoterapia i aktywność fizyczna jako podstawy zdrowia człowieka Tom 1; Wydawnictwo Naukowe TYGIEL, Lublin. Wrzesień 2024, 36-45

- Punktacja MNiSW: 20, Impact Factor: 0,0

Publikacja nr 4:

Dzidek, A.; Czerwińska-Ledwig, O.; Szlachetka, A.; Ziemann, E.; Kasprzak, D.; Zasada, M.; Piotrowska, A. *Use of Measurement Probes to Evaluate the Effect of a Series of Whole-Body Cryostimulation Treatments on Skin Characteristics in Subjects with Different BMIs.* Appl. Sci. 2025;15:2897. doi: 10.3390/app15062897

- Punktacja MNiSW: 100; Impact Factor: 2,9

Publikacja nr 5:

Dzidek, A.; Czerwińska-Ledwig, O.; Zuziak, R.; Kryst, J.; Morawiec, M.; Piotrowska, A. *Effect of a series of whole-body cryostimulation treatments on vaspin levels in subjects with different body mass indexes.* Acta Balneol. 2025;67(2):114-120. doi: 10.36740/ABAL202502106

- Punktacja MNiSW: 20; Impact Factor: 0,6

Publikacja nr 6:

Dzidek, A.; Czerwińska-Ledwig, O.; Zuziak, R.; Kryst, J.; Morawiec, M.; Szyguła, Z.; Pałka, T.; Piotrowska, A. *The effect of whole-body cryostimulation treatments on the profile of selected adipokines and sirtuins in middle-aged individuals with varying degrees of body fatness.* Cryobiology. 2026;122:105599. doi: 10.1016/j.cryobiol.2026.105599

- Punktacja MNiSW: 70; Impact Factor: 2,6

Powyższe publikacje wchodzące w skład cyklu uzyskały sumarycznie **370** punktów MNiSW oraz **14,3** punktów Impact Factor.

1. Wstęp

Krioterapia całego ciała (WBC, ang. *whole body cryotherapy/cryostimulation*) to technika polegająca na ekstremalnym schłodzeniu ciała (w temperaturze powietrza w komorze poniżej -100°C) przez krótki czas (1–3 minuty) w celu wywołania fizjologicznej reakcji na zimno [1]. Reakcją organizmu na działanie niskiej temperatury otoczenia jest inicjowanie szeregu reakcji termoregulacyjnych zapobiegających obniżeniu temperatury ciała.

Aby utrzymać stałą temperaturę, organizm aktywuje procesy termogenezy drżeniowej w mięśniach i termogenezy bezdrżeniowej w tkance tłuszczowej. W pierwszej fazie reakcji fizjologicznej naczynia krwionośne zwężają się, krew przepływa do żył głębokich, a ciepło jest oddawane do krwi żylnej o niższej temperaturze. Proces ten prowadzi do utrzymania stałej temperatury wewnątrz ciała, a wzrost napięcia mięśniowego prowadzi do wzmożonej pracy mięśni (tzw. drżenia) i wytwarzania większej ilości ciepła [2].

Celem krioterapii nie jest schłodzenie tkanki, ale wywołanie mechanizmów przenoszenia ciepła z tkanki cieplejszej do tkanki o niższej temperaturze [3]. Sam termin „krioterapia" jest używany do opisania leczenia pacjentów. Jeśli jednak zabieg ma na celu stymulację lub wsparcie bioregeneracji, stosuje się termin: kriostymulacja [4].

W Polsce pionierem zabiegów WBC był dr hab. n. med. Zdzisław Zagrobelny, kierownik Katedry Rehabilitacji Akademii Wychowania Fizycznego we Wrocławiu. Pierwsza kriokomora w Polsce powstała w 1989 r. w Instytucie Niskich Temperatur PAN we Wrocławiu. Było to trzecie na świecie, a drugie w Europie tego typu urządzenie. Zostało przetestowane z udziałem zdrowych ochotników – studentów AWF we Wrocławiu. Kolejne kriokomory zainstalowano w Szpitalu Specjalistycznym Chorób Narządu Ruchu w Kamiennej Górze oraz w AWF we Wrocławiu [5].

W Polsce, krioterapia ogólnoustrojowa jest refundowana przez Narodowy Fundusz Zdrowia, a liczbę refundowanych sesji krioterapii ogólnoustrojowej szacuje się na około 650 000 rocznie [6]. Wskazano jednak limity − jednemu pacjentowi, w ramach rehabilitacji, przysługuje 20 refundowanych zabiegów WBC/rok, realizowanych najczęściej w dwóch seriach (po 10 zabiegów).

Pojedyncze ekspozycje, jak również stosowanie serii zabiegów krioterapeutycznych, są przedmiotem wielu badań naukowych. Terapia WBC była i jest stosowana przede wszystkim w chorobach układu mięśniowo-szkieletowego (np. osteoporoza, pourazowe i przeciążeniowe zmiany w stawach i tkankach miękkich, fibromialgia i choroby zapalne) oraz układu nerwowego (np. stwardnienie rozsiane, porażenie spastyczne) [7,8]. Wykazano pozytywny wpływ WBC na stan psychiczny pacjentów: stosuje się ją między innymi w celu łagodzenia objawów depresji i lęku [9]. WBC znajduje również zastosowanie w medycynie sportowej. Wykazano, że ekstremalne zimno może poprawiać metabolizm a także pośrednio przez zmniejszenie bólu, stanu zapalnego i szybszą regenerację może poprawiać siłę fizyczną [10,11]. Ponadto coraz więcej dowodów sugeruje potencjalne zastosowanie niskich temperatur w dermatologii i kosmetologii [12–14].

Inną formą terapii zimnem jest pływanie na świeżym powietrzu w lodowatych wodach: rzekach, basenach lub jeziorach (ang. *winter swimming*, morsowanie). Badania sugerują, że zimowe kąpiele wodne przynoszą organizmowi szereg korzyści: poprawiają funkcjonowanie układu hormonalnego i krwiotwórczego, łagodzą zaburzenia nastroju i poprawiają ogólne samopoczucie [15]. Osoby regularnie korzystające z takich kąpieli wodnych zgłaszają poprawę odporności. Stwierdzono również, że stymulacja zimnem poprawia zdolność radzenia sobie

ze stresem [16]. WBC powszechnie uważane jest jednak za bardziej komfortowy sposób chłodzenia ciała. Mimo iż, nie ma rozstrzygających dowodów, wskazuje się na lepsze działanie WBC w porównaniu z tradycyjnymi metodami krioterapii [17]. Wśród badań porównujących działanie tych dwóch interwencji można wskazać np. badania Castello i wsp. [18], którzy wykazali, że temperatura skóry była istotnie niższa bezpośrednio po WBC (−110°C) w porównaniu z zanurzeniem w zimnej wodzie (−8°C), co prospektywnie będzie mieć przełożenie na efekt kliniczny.

Należy wskazać, że podczas krioterapii skóra jest bezpośrednio narażona na działanie niskich temperatur. Spadek temperatury obwodowej, głównie skórnej, wyzwala podstawowe reakcje termoregulacyjne mające na celu utrzymanie stałej temperatury ciała. Dochodzi do zwężenia naczyń krwionośnych w skórze, co zmniejsza przepływ krwi, a w konsekwencji minimalizuje transfer ciepła między rdzeniem ciała a warstwami zewnętrznymi [19,20]. Odruchowe zwężanie naczyń, w odpowiedzi na zimno osiąga maksimum, gdy temperatura skóry wynosi 31°C lub mniej [20]. Skurcz naczyń powoduje niedokrwienie tkanek, co w konsekwencji obniża szybkość procesów metabolicznych i zmniejsza odczuwanie bólu. Spadek temperatury skóry do 18°C wpływa na rozszerzanie się podskórnych naczyń krwionośnych (tzw. odruch Lewisa), zwiększa się przepływ krwi, a wraz z nim dopływ tlenu i składników odżywczych do komórek [2,20]. Cykl skurczu naczyń i wazodylatacji powtarza się co kilka-kilkanaście minut, co zapewnia minimalne dotlenienie tkanek [21].

Skóra pełni wiele funkcji, w tym wydzielniczą, sensoryczną i obronną [22]. Chroni narządy wewnętrzne i tkanki, odbiera sygnały z otoczenia i zapobiega nadmiernej utracie wody. Oprócz funkcji biologicznych, warunkuje ona wygląd fizyczny człowieka, co wpływa na jego samopoczucie i jakość życia [23]. Cechy skóry, takie jak nawilżenie, pH i transepidermalna utrata wody (TEWL, ang. *transepidermal water loss*), zapewniają integralność bariery naskórkowej. TEWL definiowany jest jako ilość pary wodnej dyfundującej przez ustalony obszar warstwy rogowej naskórka do powierzchni skóry w danej jednostce czasu. Pomiar TEWL jest jednym z najważniejszych obiektywnych pomiarów stosowanych do oceny funkcji bariery skórnej, a jej podwyższone wartości mogą świadczyć o dysfunkcji tej bariery [19]. Wpływ zabiegów z wykorzystaniem zimna na stan i funkcjonowanie skóry, czyli tkanki bezpośrednio reagującej na stosowany bodziec, nie został dotychczas w pełni poznany, a niedosyt informacji naukowych skłonił mnie do podjęcia tego typu badań.

Jak wykazały dostępne w literaturze obserwacje, wpływ zabiegów niskotemperaturowych na organizm człowieka zależy w dużej mierze od składu jego ciała [24,25]. Reakcje te są najprawdopodobniej związane z obecnością tkanki tłuszczowej pełniącej rolę izolatora termicznego. Z drugiej strony wskazano również, że skład ciała ma silny wpływ na stan skóry [26], co może mieć związek z reakcją bariery naskórkowej na zimno. Osoby z wyższym wskaźnikiem BMI mają podwyższone wyniki tewametryczne, co wskazuje na osłabienie funkcji bariery skórnej [27]. Może być to związane z obecnością przewlekłego, subklinicznego stanu zapalnego (ang. *low-grade inflammation*, stan zapalny o niskim nasileniu), który jest częścią otyłości i zespołu metabolicznego. Jego obecność wiąże się także z obserwowaną w populacji osób otyłych zwiększoną częstością występowania niektórych dermatoz [28].

Otyłość definiuje się jako nadmierne gromadzenie lub nieprawidłowy rozkład tkanki tłuszczowej w organizmie, co ma niekorzystny wpływ na zdrowie. Podstawową przyczyną otyłości jest brak równowagi pomiędzy kaloriami spożywanymi a wydatkowanymi. Nadwagę i otyłość, uważane dawniej za problem krajów o wysokich dochodach, coraz częściej obserwuje się obecnie w krajach o dochodach średnich oraz niskich. Nierzadko zdarza się, że otyłość paradoksalnie współistnieje z niedożywieniem w tym samym kraju, społeczności czy nawet

w tym samym gospodarstwie domowym [29]. Otyłość jest znanym czynnikiem ryzyka wielu chorób cywilizacyjnych, takich jak: cukrzyca typu 2 i inne zaburzenia metabolizmu węglowodanów [30], nadciśnienie tętnicze, choroba niedokrwienna serca [31], stłuszczenie wątroby [32], bezdech senny [33] oraz niektóre rodzaje nowotworów (piersi, jajnika, tarczycy, jelita grubego, trzustki, żołądka, pęcherzyka żółciowego, nerki i okrężnicy) [34]. Według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, ang. *World Health Organization*) w 2022 r. 1 na 8 osób żyła z otyłością, a 43% osób miało nadwagę. W 2024 r. 35 milionów dzieci poniżej 5 roku życia miało nadwagę. Liczba osób z nadwagą i otyłością ciągle rośnie – od 1990 roku otyłość wśród dorosłych wzrosła ponad dwukrotnie, a wśród nastolatków czterokrotnie [29].

Tkanka tłuszczowa jest zbudowana z adipocytów i charakteryzuje się heterogenną budową. Dodatkowo, tkanka ta nieustannie ulega remodelingowi. W procesie tym, przede wszystkim, preadipocyty przekształcają się w adipocyty [35]. Komórki tłuszczowe pełnią głównie funkcje magazynową i termoizolacyjną, jednak ponadto stanowią tkankę wydzielniczą. Ta funkcja sprawia, że adipocyty pośredniczą w szeregu procesów dotyczących skóry i jej przydatków: w tym regulują cykl wzrostowy włosa, promują gojenie się ran oraz modulują aktywność układu odpornościowego skóry [36].

W obrębie tkanki tłuszczowej można przede wszystkim wyróżnić białą (WAT, ang. *white adipose tissue*) oraz brązową tkankę tłuszczową (BAT, ang. *brown adipose tissue*). WAT, bogata w trójglicerydy, stanowi magazyn kwasów tłuszczowych, a jednocześnie odgyrwa w stosunku do nich rolę buforową. Reguluje przemiany hormonów płciowych, sama pełni także funkcje endokrynne [37]. BAT, zbudowana z komórek bogatych w mitochondria, odpowiada za uwalnianie energii oraz rozkład lipidów [38]. Chroniczna stymulacja układu współczulnego u osób otyłych powoduje zakłócenia funkcjonowania BAT - gromadzony jest nadmiar tłuszczu, a przebieg termogenezy zostaje zaburzony. W przypadku osób z niedoborem masy ciała, również opisano patologiczne funkcjonowania BAT, co wynika z jej atroficznego charakteru w tej populacji [39].

Otyłość nie jest jedynie izolowanym zwiększeniem ilości tkanki tłuszczowej, ale także, w konsekwencji *up*-regulacji funkcji wydzielniczej tej tkanki, obserwuje się zwiększone uwalnianie adipokin do krwiobiegu. Adipokiny są substancjami biologicznie czynnymi wydzielanymi przez tkankę tłuszczową pod wpływem różnych bodźców. Czynniki te działają miejscowo, lecz mają one również zdolność oddziaływania na bardziej odległe narządy i tkanki [40]. Źródłem jest głównie WAT, a ilość uwalnianych adipokin jest często skorelowana z ilością tej tkanki [41,42]. Wykazano, że w obrębie samej tkanki tłuszczowej adipokiny modulują adipogenezę, migrację komórek odpornościowych do tej tkanki oraz metabolizm i funkcjonowanie adipocytów [37]. Ponadto, ogólnoustrojowo, biorą one udział między innymi w regulacji apetytu i sytości [43], wydzielaniu i wrażliwości tkanek na insulinę [44] czy progresji stanu zapalnego [45]. Osoby otyłe charakteryzują się brakiem równowagi między adipokinami prozapalnymi (wskazywana jest tu m.in. leptyna (LEP), asprozyna (ASP), rezystyna (RETN), wisfatyna, chemeryna) i przeciwzapalnymi (m.in. adiponektyna (ADP), waspina (VASP), omentyna). Ta dysregulacja przyczynia się do przewlekłego stanu zapalnego o niskim nasileniu, charakterystycznego dla otyłości i może zwiększać ryzyko wystąpienia niektórych chorób, w tym chorób metabolicznych [46–48].

Ze względu na ogólnoświatowy problem otyłości, adipokiny zyskują coraz większe znaczenie w diagnostyce i nowych strategiach farmakologicznych tej jednostki chorobowej [48]. Pełen zestaw ludzkich adipokin nie jest jeszcze całkowicie poznany, jednak ponad 600 wydzielanym białkom przypisuje się potencjalną rolę adipokin [49].

U osób z nadwagą stwierdza się wyższe stężenie we krwi takich adipokin jak LEP [50] i ASP [51] oraz niższe stężenie ADP [52,53] w porównaniu z osobami o masie ciała zgodnej z normami.

Leptyna jest białkiem o charakterze prozapalnym, powstającym głównie w dojrzałych adipocytach [54]. Bierze udział w kontroli apetytu, uczucia sytości, przyjmowania pokarmu, wydatku energetycznym oraz funkcjach rozrodczych człowieka [55]. Wydzielanie tego hormonu do krwi jest stymulowane przez insulinę i glikokortykosteroidy a hamowane uwalnianiem glukagonu i amin katecholowych (adrenalina i noradrenalina). Biosynteza LEP jest zależna od masy tkanki tłuszczowej oraz wielkości adipocytów – zwiększa się u pacjentów z otyłością oraz po spożyciu pokarmu i zmniejsza przy utracie masy ciała oraz podczas postu [56]. W komórkach tkanki tłuszczowej osób otyłych wykazano nawet dwukrotnie wyższą ekspresję mRNA dla LEP w stosunku do komórek pozyskanych od osób szczupłych [57]. Podobną zależność można zauważyć w stężeniu LEP w osoczu – szacuje się, że może być ono nawet kilkukrotnie wyższe u osób otyłych (nawet ponad 30 ng/ml) w stosunku do osób szczupłych (norma dla osób o prawidłowej masie ciała: 2-8 ng/ml) [58].

Kolejna adipokina, ASP jest odkrytym w 2016 r. hormonem peptydowym, wydzielanym głównie przez WAT, podobnie jak leptyna uważanym za substancję działającą prozapalnie i diabetogennie [53]. Ekspresja asprozyny jest indukowana w stanie głodzenia i proces ten jest skorelowany z uwalnianiem glukozy z wątroby. Stwierdzono, że stężenie tej adipokiny podlega dobowym wahaniom – zwiększa się w okresie głodzenia i zmniejsza wraz z początkiem przyjęcia pokarmu [59]. Kolejne badania sugerują, że oprócz udziału w metabolizmie glukozy może ona odpowiadać za utrzymanie równowagi energetycznej całego organizmu. Dowiedziono, że jej stężenie jest patologicznie podwyższone u osób z otyłością oraz insulinoopornością [53]. W modelu zwierzęcym udowodniono, że zastosowanie przeciwciał, które neutralizują działanie asprozyny korzystnie wpływa na efekt metaboliczny: redukuje apetyt i nadmierną masę ciała, poprawia profil glikemii oraz wrażliwość tkanek na insulinę [60]. Więcek i wsp. [61] dowiedli, że zastosowanie serii 20 zabiegów WBC obniża stężenie asprozyny, co sugeruje, że zabiegi w kriokomorze mogą być stosowane jako wspomaganie zaburzeń metabolicznych oraz insulinooporności.

Adiponektyna jest przeciwzapalną adipokiną, wydzielaną w dużych ilościach głównie przez tkankę tłuszczową [62]. Stymuluje utlenianie kwasów tłuszczowych w mięśniach szkieletowych i hamuje produkcję glukozy w wątrobie, co prowadzi do poprawy homeostazy energetycznej całego organizmu [63]. Wykazano, że stężenie adiponektyny w surowicy jest obniżone u osób z otyłością [64,65]. Badania przeprowadzone w modelu zwierzęcym wykazały, że podawanie adiponektyny prowadzi do zwiększania wrażliwości na insulinę oraz wykazuje działanie przeciwmiażdżycowe i przeciwzapalne. Modulowanie stężenia adiponektyny może stanowić potencjalny cel terapeutyczny w leczeniu otyłości, miażdżycy oraz insulinooporności/cukrzycy typu 2 [66]. W przeglądzie Achari i Jain [52] wskazano, że czynnikami wpływającymi na stężenie tej adipokiny mogą być: farmakoterapia, dieta i suplementacja oraz intensywny wysiłek fizyczny. Wskazano także na wzrost stężenia adiponektyny po serii zabiegów WBC [67].

Waspina jest serpiną pochodzącą z trzewnej tkanki tłuszczowej [68]. WAT została zidentyfikowana jako jeden z organów docelowych działania tej adipokiny, a mechanizm prawdopodobnie obejmuje normalizację ekspresji mRNA transportera glukozy-4, LEP, RETN i ADP [69]. Stężenie VASP we krwi zmienia się w zależności od ilości tkanki tłuszczowej w organizmie i jest dodatnio skorelowany z BMI. Znacznie niższe stężenia VASP zaobserwowano w surowicy dzieci z niedowagą w porównaniu z grupą kontrolną, podczas gdy

ekspresja genu dla tej serpiny jest regulowana w górę wraz ze wzrostem masy ciała [68]. Wyższe stężenia VASP występują u osób z insulinoopornością i cukrzycą typu II [70]. Organizm zwiększa jej produkcję jako odpowiedź kompensacyjną na zaburzenia metaboliczne. Adipokina ta bierze również udział w regulacji apetytu, co łączy się z dobowymi zmianami stężenia tego białka [71]. Odnotowano, że wraz z umiarkowaną utratą masy ciała ilość VASP w surowicy zmniejszała się, czemu równolegle towarzyszyła poprawa parametrów związanych z insulinoopornością [72].

Sirtuiny (SIRT) u ssaków stanowią grupę 7 enzymów (SIRT1-SIRT7), które uczestniczą w post-translacyjnej modyfikacji białek. Odgrywają one ważną rolę w utrzymaniu zdrowia RETN i wpływają na wiele szlaków przyczyniających się do zwiększenia długości życia [73]. Początkowo sirtuiny badano przede wszystkim w kontekście starzenia się organizmów RETN i wyciszania genów (ang. *gene silencing*), następnie odkryto jednak wiele innych funkcji biologicznych białek należących do tej grupy [74]. Obecnie wiadomo, iż SIRT regulują szereg procesów komórkowych, takich jak: metabolizm lipidów oraz glukozy, kancerogeneza, apoptoza, starzenie się komórki czy naprawa DNA [75]. SIRT1 reguluje procesy glukoneogenezy oraz glikolizy, a także transkrypcje genów w odpowiedzi na bodźce stresowe (m.in. stan zapalny, hipoksja, post). SIRT4 przyczynia się do utrzymania odpowiedniego poziomu lipidów w organizmie prowadząc do obniżenia tempa biosyntezy kwasów tłuszczowych. SIRT1 oraz SIRT4 wpływają na wydzielanie insuliny z komórek β trzustki [75]. SIRT6 spowalnia przebieg glukoneogenezy, kontroluje geny związane z metabolizmem oraz cyklem okołodobowym, a także jest silnie powiązana z aktywnością czynników prozapalnych i starzeniem się komórek [76].

Na początku XXI w. zauważono, że w wyniku głodzenia dochodzi do wzrostu aktywności białek z grupy SIRT [77]. Wskazano, że długotrwałe ograniczenie podaży kalorii o 30-50% w diecie prowadzi do spowolnienia starzenia się organizmu [78]. Efekt ten nie występuje, gdy uszkodzone są geny kodujące te białka i ulega wzmocnieniu, w przypadku nadekspresji tych genów [79]. Wykazano, że ekspresja sirtuin jest silniejsza w tkance tłuszczowej niż w wątrobie, a silna redukcja masy ciała (np. w konsekwencji zabiegu bariatrycznego) powoduje zwiększoną ekspresję tych białek zarówno w hepatocytach, jak i komórkach tkanki tłuszczowej. Zakłada się, że może być to efektem zmniejszenia nasilenia stanu zapalnego i obniżenia ilości cytokin prozapalnych [80]. Co ciekawe, takie działanie zaobserwowano również dla kriostymulacji [81,82]. Wskazano, że wielokrotne zabiegi WBC mogą być stosowane jako terapia wspomagająca w celu zwiększenia stężenia wybranych sirtuin – SIRT1 i SIRT3 [83].

Globalna epidemia otyłości pobudziła rozwój badań nad tkanką tłuszczową i czynnikami, które na nią wpływają. Obecnie dostępne metody leczenia otyłości obejmują terapię żywieniową, dostosowaną aktywność fizyczną, zmiany zachowań, farmakoterapię i chirurgię bariatryczną [84]. W kontekście trwającego globalnego kryzysu otyłości, identyfikacja skutecznych, uzupełniających strategii interwencyjnych wydaje się mieć kluczowe znaczenie dla zwiększenia prawdopodobieństwa skutecznej redukcji masy ciała i złagodzenia ogólnoustrojowego stanu zapalnego. W literaturze pojawia się coraz więcej danych dotyczących potencjału WBC jako niefarmakologicznego środka wspomagającego leczenie otyłości, zaburzeń metabolicznych [61,85] i poprawy profilu lipidowego [86,87].

2. Cel pracy, pytania oraz hipotezy badawcze

2.1. Cel pracy

Celem niniejszej dysertacji była ocena zmian wywołanych zastosowaniem pojedynczego bodźca kriogenicznego oraz serii 10. i 20. zabiegów krioterapii ogólnoustrojowej w zakresie wybranych parametrów biofizycznych skóry, profilu adipokin i sirtuin oraz wskaźników metabolizmu węglowodanów u osób z nadwagą i otyłością, a także określenie różnic w odpowiedzi na interwencję w zależności od wartości wskaźnika BMI.

2.2. Pytania badawcze

Postawiono następujące pytania badawcze:

1. Jak zmieniają się poszczególne cechy skóry: stopień nawilżenia warstwy rogowej naskórka, transepidermalna ucieczka wody, odczyn kwasowo-zasadowy oraz poziom elastyczności skóry w odpowiedzi na pojedynczy zabieg oraz standardową (10) i powiekszoną (20) liczbę zabiegów krioterapii ogólnoustrojowej u badanych osób?

2. Czy wartość wskaźnika BMI moduluje badane cechy skóry oraz czy zmienne te będą wpływały na uzyskane efekty po-zabiegowe?

3. Czy/Jak standardowa (10) oraz powiększona (20) liczba zabiegów krioterapii ogólnoustrojowej wpływa na aktywność endokrynną tkanki tłuszczowej, poprzez zmiany stężenia leptyny, asprozyny, waspiny i adiponektyny? Czy efekt ten utrzymuje się po zakończeniu serii zabiegowej?

4. Czy występuje korelacja pomiędzy zmianami w profilu wydzielanych adipokin a wartością wskaźnika BMI?

5. Czy/i w jakim stopniu standardowa (10) oraz powiększona (20) liczba zabiegów krioterapii ogólnoustrojowej wpływa na zmiany stężenia sirtuin: SIRT1, SIRT4 oraz SIRT6 we krwi u osób o prawidłowym i podwyższonym BMI? Czy efekt ten utrzymuje się po zakończeniu serii zabiegowej?

6. Czy/Jak standardowa (10) oraz powiększona (20) liczba zabiegów krioterapii ogólnoustrojowej wpływa na zmiany w stężeniach we krwi wskaźników metabolizmu węglowodanów: glukozy, insuliny, hemoglobiny glikowanej u osób o prawidłowym i podwyższonym BMI? Czy efekt ten utrzymuje się po zakończeniu serii zabiegowej?

2.3. Hipotezy badawcze

1. Pojedynczy zabieg oraz serie 10. i 20. zabiegów WBC spowodują istotne zmiany parametrów biofizycznych skóry, przy czym większa liczba zabiegów będzie związana z większą skalą zmian.

2. Wartość wskaźnika BMI determinuje wyjściowe parametry cech skóry, w szczególności wyższe wartości TEWL przed rozpoczęciem interwencji będą odnotowane u osób z podwyższonym wskaźnikiem BMI. Reakcja skóry osób z prawidłowym i podwyższonym BMI będzie różna.

3. Seria zabiegów krioterapii ogólnoustrojowej wpłynie na profil wybranych adipokin (leptyny, asprozyny, adiponektyny i waspiny), przy czym zakres i kierunek obserwowanych zmian będą zależne od wartości wskaźnika BMI. U osób z podwyższonym BMI zmiany w profilu adipokin będą wskazywały na modulację funkcji endokrynnej tkanki tłuszczowej, a efekt ten będzie utrzymywał się po zakończeniu interwencji.

4. U osób z nadwagą i otyłością zmiany w profilu wydzielanych adipokin po zastosowaniu serii zabiegów krioterapii ogólnoustrojowej będą związane z wyjściową wartością wskaźnika BMI. Osoby z wyższym wskaźnikiem BMI będą wykazywały odmienną skalę zmian stężeń wybranych adipokin w porównaniu do osób z niższym BMI.

5. Seria zabiegowa WBC pozytywnie wpłynie na zmiany stężenia sirtuin, jednak u osób z podwyższoną wartością wskaźnika BMI większa liczba zabieg będzie konieczna do uzyskania obserwowalnych zmian (20). Efekty te będą utrzymywały się także po zakończeniu interwencji.

6. Seria zabiegów WBC nie wpłynie na zmiany w metabolizmie węglowodanów u osób o prawidłowym wskaźniku BMI, u osób z podwyższoną wartością wskaźnika BMI nastąpią korzystne zmiany wskaźników metabolizmy węglowodanów. W tej grupie, efekty te będą utrzymywały się także po zakończeniu interwencji.

3. Materiał i metody badawcze

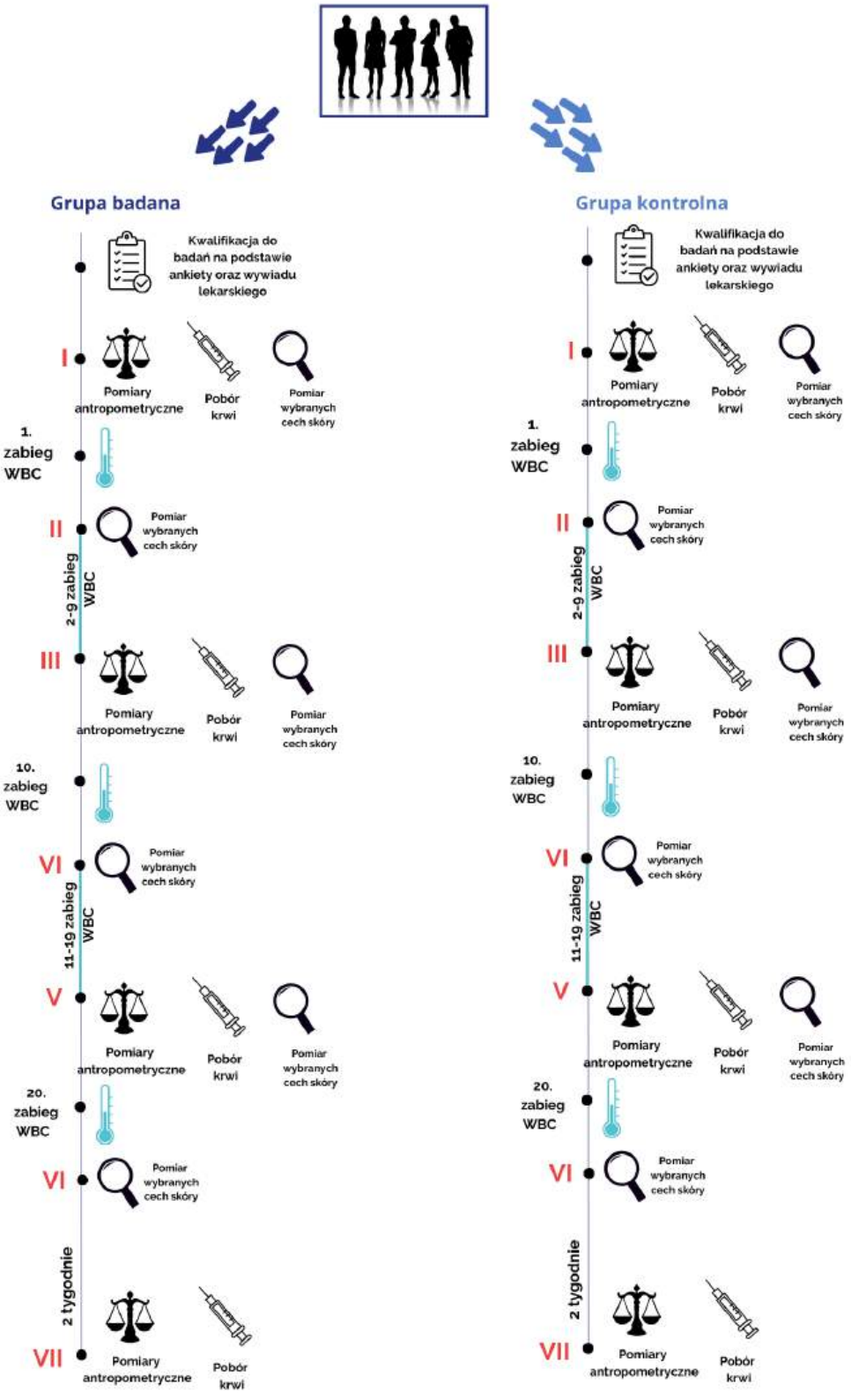
3.1. Protokół badania

Protokół projektu został zatwierdzony przez Komisję Bioetyczną Regionalnej Izby Lekarskiej w Krakowie (177/KBL/OIL/2023 z dnia 25.09.2023 r.). Projekt został retrospektywnie zarejestrowany w rejestrze badań klinicznych na platformie ANZCTR (ang. *Australian New Zealand Clinical Trials Registry*): numer rejestracji ACTRN12626000168358 (10.02.2026 r.).

Przeprowadzone badanie stanowiło prospektywne badanie interwencyjne z grupą kontrolną i pomiarami powtarzanymi (ang. *longitudinal repeated-measures study*). Dobór grup nie był randomizowany a uczestników w grupie kontrolnej dobierano tak, aby odpowiadali uczestnikom grupy badanej pod względem określonych zmiennych.

Badanie obejmowało serię 20 zabiegów krioterapii ogólnoustrojowej wykonywanych codziennie (przez 4 tygodnie, z wyjątkiem sobót i niedziel). Wolontariusze mogli opuścić maksymalnie jeden zabieg; w przypadku większej liczby nieobecności uczestnik był wykluczany z projektu.

Pomiary składu ciała i pobranie próbek krwi przeprowadzono przed pierwszym, dziesiątym i dwudziestym zabiegiem WBC oraz dwa tygodnie po zakończeniu kriostymulacji. Wybrane parametry skóry mierzono bezpośrednio przed i po 1., 10. i 20. sesji WBC w dwóch miejscach: na twarzy w pobliżu kości jarzmowej oraz na wewnętrznej stronie przedramienia (ryc. 1). Założono, że badanie będzie przeprowadzane na ręce dominującej.



Rycina 1. Protokół badań

3.2. Materiał

3.2.1. Grupa badana

Wartość BMI jest stosowana jako szybki marker pozwalający na ocenę masy ciała. Wskazane zakresy obejmują:

- niedowaga: BMI poniżej 18,5 kg/m^2;

- prawidłowa masa ciała: BMI 18,5 - 24,9 kg/m^2;

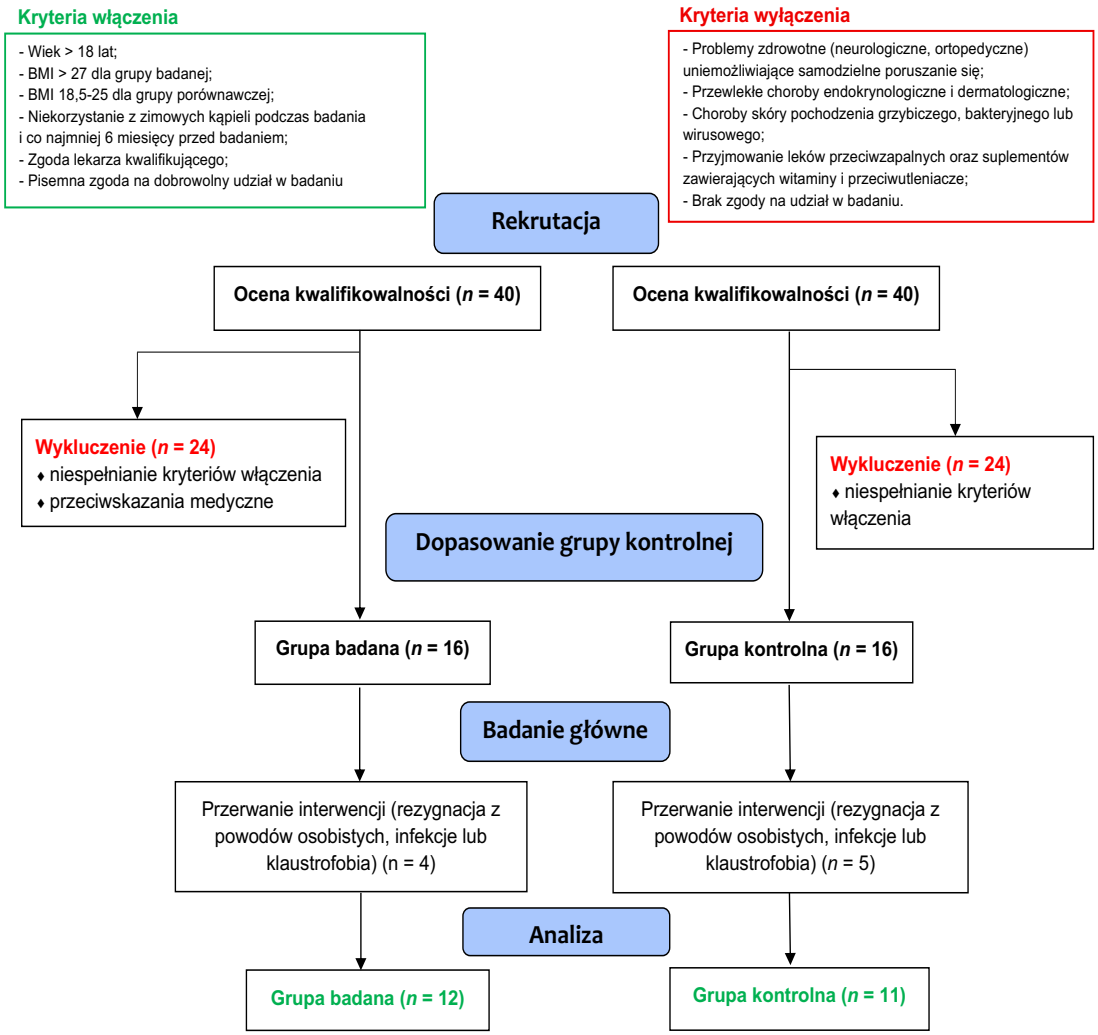
- nadwaga: BMI 25-29,9 kg/m^2;

- otyłość I stopnia: BMI 30-34,9 kg/m^2;

- otyłość II stopnia: BMI 35-39,9 kg/m^2,

- otyłość III stopnia: BMI większe lub równe 40 [88].

Do badania zrekrutowano grupę ochotników, spośród których wybrano osoby o prawidłowej masie ciała oraz osoby z nadwagą lub otyłe. W każdej grupie zebrano wywiad medyczny i przeprowadzono kwalifikacje na podstawie kryteriów włączenia i wykluczenia. Wolontariusze biorący udział w badaniu zostali podzieleni zgodnie z określonymi kryteriami na grupę badaną (SG; BMI > 27 kg/m^2) oraz grupę kontrolną (CG; BMI 18,5 – 25 kg/m^2). Podczas fazy rekrutacji ochotnicy z grupy CG zostali dopasowani pod względem wieku i płci do ochotników z grupy SG, aby zapewnić porównywalność grup i zminimalizować ryzyko potencjalnych czynników zakłócających. Ostatecznie projekt ukończyły 23 osoby a ze względu na rezygnacje uczestników w trakcie trwania projektu, ostateczny rozkład zmiennych niekontrolowanych (np. płeć) nie był homogenny w wyłonionych grupach (ryc. 2).



Rycina 2. Schemat rekrutacji i badań ochotników

Przed rozpoczęciem badania uczestnicy zapoznali się z jego protokołem, celami i metodami w tym ewentualnymi korzyściami i ryzykiem wynikającym z udziału w projekcie oraz podpisali formularze świadomej zgody. Udział w projekcie był całkowicie dobrowolny. Każdy ochotnik został poinformowany, że może wycofać się z projektu na dowolnym etapie bez podania przyczyny. Przed badaniem każdy z wolontariuszy odbył indywidualną konsultację lekarską.

Do kryteriów wykluczenia należały przeciwwskazania dla WBC zgodne z najnowszymi wytycznymi [89], a także przyjmowanie leków stosowanych w farmakoterapii otyłości, przeciwzapalnych i suplementów zawierających witaminy i przeciwutleniacze oraz brak wyrażenia pisemnej, świadomej zgody na udział w projekcie.

3.3. Metody badawcze

3.3.1. Pomiary antropometryczne

Masa ciała została zmierzona przy użyciu metody bioimpedancji za pomocą wagi Jawon Medical IOI-IOI-353-CE0197 (Jawon Medical Co., Ltd., Gyeongsan, Republika Korei). Wzrost został zmierzony jednokrotnie za pomocą miernika wzrostu Seca 216 (Hamburg, Niemcy) z dokładnością do 5 mm. Ponadto dla każdego ochotnika obliczono wskaźnik BMI. Obwody talii i bioder zmierzono za pomocą taśmy antropometrycznej z dokładnością do 5 mm, zgodnie z zaleceniami WHO: talia - w połowie odległości między dolną krawędzią ostatniego łuku żebrowego a wierzchołkiem grzebienia biodrowego; biodra - w miejscu największego obwodu nad pośladkami [90]. Dla każdego badanego obliczono wskaźniki: WHtR (stosunek talii do wzrostu, ang. *waist-to-height ratio*), określający stosunek obwodu talii do wzrostu, oraz WHR (stosunek talii do bioder, ang. *waist-to-hip ratio*), określający stosunek obwodu talii do obwodu bioder.

3.3.2. Pomiary wybranych cech skóry

Parametry skórne mierzono zgodnie z protokołem Laboratorium Fizjologii Skóry (CLNB) Akademii Kultury Fizycznej w Krakowie (certyfikat nr PN-EN ISO 9001:2015: PW-08606-19). Pomiary przeprowadzono na zdrowej, nieuszkodzonej skórze. Wykorzystano system Multi Probe Adapter (MPA) (Courage-Khazaka GmBH, Kolonia, Niemcy). Zestaw zawierał sondy pomiarowe tego samego producenta:

- Corneometer CM 825 (błąd pomiaru: ± 3%);
- Tewameter TM 300 (błąd pomiaru: utrata wody: ± 0,5 g/h/m^2 dla RH ≥ 30%; ±1,0 g/h/m^2 dla RH ≤ 30%);
- Skin-pH-Meter PH 905 (błąd: ± 0,1);
- Cutometer Dual MPA 580.

W pomieszczeniu, w którym mierzono biofizyczne cechy skóry, panowały stałe warunki, zgodnie z wymaganiami producenta sond pomiarowych, z wilgotnością 45% i temperaturą powietrza 21°C. Były one stale monitorowane podczas wykonywania pomiarów.

Ze względu na przechowywanie elektrody do pomiaru pH w roztworze wodnym chlorku potasu, aby nie zakłócić wyników pomiarów innych parametrów, pomiar pH skóry przeprowadzono jako ostatni z serii analiz.

Do pomiarów korneometrycznych i pH-metrycznych zastosowano metodę 1-sekundową, a do pomiarów tewametrycznych metodę ciągłą (20 s). Cykl pomiarowy wykonany kutometrem obejmował fazę zassania (skóra była zasysana próżnią przez 3 s) i fazę relaksacji trwającą 3 s. Analizowanymi w niniejszej dysertacji parametrami kutometru były: R0, określający jędrność skóry oraz R2 określający wiskoelastyczność skóry.

Wszystkie pomiary zostały wykonane w określonym miejscu (na twarzy w okolicy kości jarzmowej oraz na wewnętrznej stronie przedramienia ręki dominującej) trzykrotnie, a następnie obliczono średnią arytmetyczną wyników.

3.3.3. Pobieranie krwi i ocena stężeń parametrów biochemicznych

Próbki krwi żylnej zostały pobrane przez diagnostę laboratoryjnego z żył dołu odłokciowego przy użyciu systemu próżniowego (Vacumed FL Medical, Włochy). W celu uzyskania surowicy krew pobrano do probówek zawierających aktywator krzepnięcia, pozostawiono do wytworzenia skrzepu, a następnie odwirowano a surowicę przeniesiono pipetą do probówek kriogenicznych. Po uprzednim stopniowym zamrożeniu materiał przechowywano w temperaturze -80°C do momentu przeprowadzenia analiz laboratoryjnych. W celu uzyskania surowicy do pomiaru stężenia glukozy we krwi na czczo (FBG) użyto probówki z inhibitorem glikolizy (fluorkiem sodu).

Stężenia białek, adipokin i sirtuin określono przy użyciu gotowych zestawów odczynników do wysokoczułych testów immunoenzymatycznych (ELISA): LEP (DRG Instruments GmbH, Niemcy), ADP (Mediagnost, Niemcy) ASP, WASP i SIRT (Sunredbio SRB Technology Co., Ltd, Chiny) (Tabela 1.).

Wskaźniki biochemiczne: FBG, insulina, fruktozamina i hemoglobina glikozylowana A1c (HbA1c) zostały oznaczone w laboratorium medycznym Diagnostyka Medical Laboratories, posiadającym akredytację Polskiego Centrum Akredytacji nr AM 003. Oznaczenia wykonano zgodnie ze standardowymi procedurami diagnostyki laboratoryjnej. Dodatkowo, aby lepiej zilustrować metabolizm węglowodanów, obliczono wskaźniki HOMA-IR (ang. *Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance*) i QUICKI (ang. *Quantitative Insulin Sensitivity Check Index*) [91,92].

Tabela 1. Charakterystyka testów

	Test	Czułość	Zakres testu
Leptyna	Leptin Sandwitch ELISA; DRG Instruments GmbH, Germany	0,7 ng/ml	0,7 – 100 ng/ml
Adiponktyna	Adiponectin ELISA; Mediagnost, Germany	< 0,27 ng/ml	0,27 – 31000 ng/ml
Asprozyna	Human (asprosin) ELISA Kit; Sunredbio Technology Co.,Ltd, Shanghai	0,756 ng/ml	1 – 300 ng/ml
Waspina	Human (vaspin) ELISA Kit; Sunredbio Technology Co.,Ltd, Shanghai	12,371pg/ml	15 – 3500 pg/ml
SIRT1	Human (SIRT1) ELISA Kit; Sunredbio Technology Co.,Ltd, Shanghai	0,306 ng/ml	0,5 – 40 ng/ml
SIRT4	Human (SIRT4) ELISA Kit; Sunredbio Technology Co.,Ltd, Shanghai	0,106 ng/ml	0,15 – 40 ng/ml
SIRT6	Human (SIRT6) ELISA Kit; Sunredbio Technology Co.,Ltd, Shanghai	0,306 ng/ml	0,5 – 40 ng/ml

3.3.4. Zabiegi WBC

Zabiegi WBC przeprowadzano w Małopolskim Centrum Krioterapii w Krakowie. Przygotowanie do zabiegu przebiegało zgodnie ze standardowo przyjętymi protokołami. Przed zabiegiem WBC proszono uczestników badania o ściągnięcie biżuterii, soczewek kontaktowych i okularów oraz założenie odpowiedniego stroju: kostiumu kąpielowego/szortów, getrów lub długich skarpet zakrywających piszczele i stawy kolanowe,

chodaków z grubą podeszwą, rękawiczek, czapki i maski zakrywającej nos i usta. Przed każdym wejściem do komory kriogenicznej wykonywano pomiar ciśnienia krwi (ciśnienie krwi powyżej 160/100 mmHg stanowiło kryterium wykluczenia z dalszego udziału w projekcie).

Każda procedura WBC obejmowała 30-sekundową aklimatyzację w przedsionku komory kriogenicznej (-60°C) oraz 3-minutowy zabieg w komorze kriogenicznej (-120°C). Badani poruszali się w komorze jeden za drugim, zmieniając kierunek poruszania się co 30 sekund. Po zakończeniu zabiegu badani opuszczali komorę kriogeniczną przez jej przedsionek. Natychmiast po wyjściu uczestnicy byli poddawani pomiarom charakterystyki skóry, a następnie skierowani do sali treningowej, gdzie wykonywali ćwiczenia aerobowe.

Każda procedura była wykonywana pod nadzorem specjalisty, który obserwował ochotników przez cały czas trwania zabiegu, aby zapewnić jak największe bezpieczeństwo i możliwość szybkiej reakcji w razie wystąpienia nieprzewidzianych zdarzeń. Uczestnicy zostali również poinformowani, że mogą opuścić sesję w komorze kriogenicznej przed czasem, jeśli odczują dyskomfort.

3.3.5. Analiza statystyczna

Wyniki analizowano przy użyciu oprogramowania JASP 0.19.3 (Uniwersytet Amsterdamski, Amsterdam, Niderlandy). Uzyskane wyniki przedstawiono za pomocą podstawowych statystyk opisowych. Rozkład zmiennych analizowano za pomocą testu Shapiro-Wilka. Wstępne cechy charakterystyczne badanych grup porównano za pomocą testu t-Studenta dla grup niezależnych. W przypadku zmiennych o rozkładzie normalnym i spełnieniu wszystkich pozostałych założeń zastosowano test ANOVA z powtarzanymi pomiarami (RMANOVA) z testami post hoc (test Bonferroniego). W przypadku naruszenia założenia sferyczności (test Mauchly'ego) zastosowano korekty Greenhouse'a-Geissera. W przypadku zmiennych o rozkładzie innym niż normalny zastosowano nieparametryczny test Friedmana, a jako test post hoc: test Conover'a. Do porównania dwóch niezależnych grup o rozkładzie innym niż normalny zastosowano nieparametryczny test Manna-Whitney'a. Wielkość efektu obliczono za pomocą współczynnika Omega kwadrat (ω^2) i zinterpretowano w następujący sposób: 0,01 – mały, 0,06 – umiarkowany i 0,14 – duży efekt. Siła (wielkość) w testach post hoc mierzono za pomocą współczynnika Cohena (d) i interpretowano w następujący sposób: 0,2 – mały, 0,5 – umiarkowany i 0,8 – duży efekt. Obecność korelacji sprawdzono za pomocą testu Spearmana (rho). Poziom istotności (α) ustalono w każdym przypadku na $p < 0,05$.

Do oszacowania wielkości próby potrzebnej w niniejszym badaniu wykorzystano program komputerowy G*Power. Przy założeniu analizy wariancji z powtarzanymi pomiarami (ANOVA: *repeated measures, within-between interaction*), średniej wielkości efektu (f = 0,25), poziomu istotności $\alpha = 0,05$, mocy testu 80%, dwóch grup badawczych oraz czterech punktów pomiarowych minimalna liczebność próby wynosiła 24 uczestników.

4. Najważniejsze wyniki

Przegląd literatury naukowej (**publikacje nr 1, 2, 3** niniejszej dysertacji) pozwolił na podsumowanie aktualnej wiedzy dotyczącej zastosowania temperatur kriogenicznych w kosmetologii oraz ich wpływu na cechy skóry, roli zwiększonej ekspresji sirtuiny 6 w zapobieganiu przedwczesnym mechanizmom starzenia się oraz roli leptyny w otyłości. Wskazane monografie, stanowią integralną część niniejszej pracy doktorskiej, przygotowanej jako zbiór opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych. Przeglądy narracyjne stanowią teoretyczny wstęp do empirycznej części niniejszej dysertacji, uzasadniając założone hipotezy badawcze. Szczegółowy opis uzyskanych podczas analiz literatury wyników został przedstawiony we wspomnianych trzech opublikowanych pracach wchodzących w skład cyklu.

4.1. Charakterystyka grup

Proces kwalifikacji, przydział oraz liczebność grup przedstawiono na rycinie 1. (Schemat rekrutacji i badań ochotników). Grupę badaną stanowiło 6 kobiet i 6 mężczyzn. Grupę kontrolną: 8 kobiet i 3 mężczyzn. Uczestników z grupy kontrolnej dobierano pod względem określonych zmiennych do grupy badanej, gdzie priorytetowym czynnikiem zmiennym była wartość BMI. Szczegółowe dane dotyczące charakterystyki grup zostały przedstawione w tabeli 2.

Tabela 2. Charakterystyka grup

	SG		**CG**		***p***
	$\bar{x}$	**SD**	$\bar{x}$	**SD**	**SG vs. CG**
Wiek [lata]	43,92	13,08	43,55	11,5	0,989
Masa ciała [kg]	92,7	12,96	69,13	10,34	**0,006***
Wysokość ciała [cm]	171,67	8,34	171,36	8,65	0,839
BMI [kg/m^2]	31,34	2,57	23,47	2,29	**< 0,001***
WHR	0,95	0,08	0,86	0,06	0,216
WHtR	0,59	0,04	0,47	0,05	**< 0,001***

SG – grupa badana, GC – grupa kontrolna, $\bar{x}$ – średnia, SD – odchylenie standardowe, BMI – wskaźnik masy ciała, WHR – wskaźnik proporcji obwodu talii do obwodu bioder, WHtR – wskaźnik, * – wynik istotny statystycznie.

4.2. Zmiany cech skóry

Wyniki dotyczące zmian parametrów biofizycznych skóry pod wpływem zastosowanej interwencji zostały przedstawione w artykule*: Use of Measurement Probes to Evaluate the Effect of a Series of Whole-Body Cryostimulation Treatments on Skin Characteristics in Subjects with Different BMIs*, wchodzącym w skład niniejszej dysertacji (**publikacja nr 4**). Szeroka analiza dostępnej literatury na temat wpływu temperatur kriogenicznych na stan skóry

przeprowadzona przed wykonaniem niniejszych badań posłużyła do napisania kolejnej pracy wchodzącej w zakres dysertacji: *The Use of Cryotherapy in Cosmetology and the Influence of Cryogenic Temperatures on Selected Skin Parameters - A Review of the Literature* (**publikacja nr 1**).

Cechy biofizyczne skóry zmierzone przed przystąpieniem do badania przedstawiono w tabeli 3. Wskazały one istotne różnice pomiędzy grupą badaną i kontrolną dla wielkości TEWL dla twarzy ($p < 0{,}001$; d = 1,665; bardzo duża siła efektu) i parametru R0 na twarzy ($p < 0{,}001$; d = 2,611; bardzo duża siła efektu) oraz przedramieniu ($p < 0{,}001$; d = 2,324; bardzo duża siła efektu).

Tabela 3. Podstawowe cechy biofizyczne skóry uczestników na twarzy i przedramieniu

	Twarz										
	SG					**CG**					***p***
	$\bar{x}$	**SD**	**Med**	**Min**	**Max**	$\bar{x}$	**SD**	**Med**	**Min**	**Max**	**SG vs. CG**
Nawilżenie [IU]	51,73	13,12	52,30	26,07	72,93	55,77	8,91	55,53	42,47	68,93	0,185
TEWL [g/m²/h]	20,28	3,42	19,42	15,81	27,12	10,94	3,50	10,50	5,80	16,80	**< 0,001***
pH	4,89	0,55	4,83	4,05	6,02	4,81	0,78	5,00	3,47	5,85	0,715
R0	0,30	0,06	0,33	0,21	0,38	0,18	0,03	0,18	0,13	0,23	**< 0,001***
R2	77,04	13,96	77,69	51,63	96,90	65,52	10,52	66,77	53,63	85,93	0,061
	Przedramię										
	SG					**CG**					***p***
	$\bar{x}$	**SD**	**Med**	**Min**	**Max**	$\bar{x}$	**SD**	**Med**	**Min**	**Max**	**SG vs. CG**
Nawilżenie [IU]	40,77	8,84	38,45	30,40	57,53	44,91	6,92	45,90	35,20	55,70	0,074
TEWL [g/m²/h]	20,74	12,26	15,71	9,54	42,64	12,94	5,79	11,10	7,06	25,90	0,111
pH	4,98	0,74	4,64	4,19	6,66	4,67	0,73	4,67	3,76	5,84	0,273
R0	0,29	0,04	0,29	0,22	0,35	0,19	0,02	0,19	0,17	0,22	**< 0,001***
R2	79,86	6,77	81,30	69,33	90,17	75,76	6,97	77,37	64,47	83,67	0,369

SG – grupa badana, GC – grupa kontrolna, $\bar{x}$ – średnia, SD – odchylenie standardowe, BMI – wskaźnik masy ciała, TEWL – transepidermalna ucieczka wody, R0 – jędrność skóry, R2 – wiskoelastyczność skóry, * – wynik istotny statystycznie.

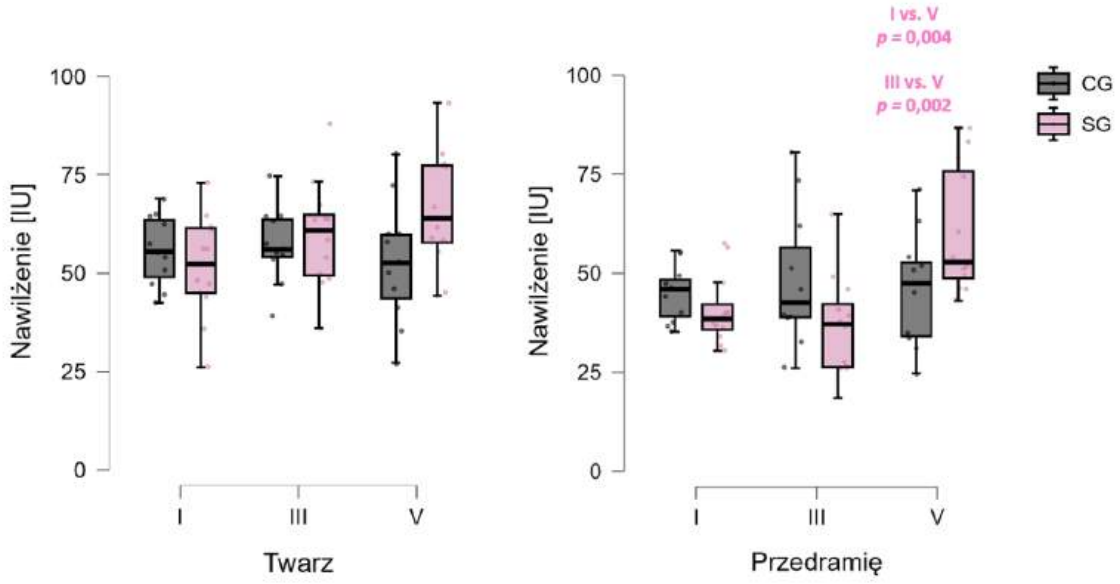
Początkowo analizowano wpływ pojedynczej ekspozycji na zimno na wybrane cechy skóry. Sprawdzono wpływ 1., 10. i 20. zabiegu WBC. Wskazano różne zmiany dla SG i CG. W grupie osób w normowadze stwierdzono istotny wzrost nawilżenia warstwy rogowej naskórka przedramienia po 1. zabiegu ($p = 0{,}020$; d = −0,835; duża siła efektu) oraz wzrost parametru R2 kutometru na przedramieniu po 20. zabiegu ($p = 0{,}025$; d = −0,796; umiarkowana siła efektu). U osób z nadwagą lub otyłością: stwierdzono istotny spadek TEWL na przedramieniu po 10. zabiegu ($p = 0{,}045$; d = 0,652; umiarkowana siła efektu) i 20. zabiegu ($p = 0{,}030$; d = 0,721; umiarkowana siła efektu). W badanych grupach nie odnotowano żadnych różnic po pojedynczym zastosowaniu bodźca kriogenicznego w postaci WBC dla cech biofizycznych skóry twarzy (tab. 4).

Tabela 4.Ocena wpływu jednorazowej ekspozycji na zimno

		SG			CG		
		p **I vs. II**	***p*** **III vs. IV**	***p*** **V vs. VI**	***p*** **I vs. II**	***p*** **III vs. IV**	***p*** **V vs. VI**
Nawilżenie [IU]	**Twarz**	0,080	0,089	0,167	0,511	0,103	0,561
	Przedramie	0,332	0,850	0,117	**0,020***	0,328	0,156
TEWL [g/m²/h]	**Twarz**	0,482	0,141	0,089	0,291	0,061	0,082
	Przedramie	0,710	**0,045***	**0,030***	0,341	0,290	0,128
pH	**Twarz**	0,595	0,594	0,339	0,093	0,231	0,445
	Przedramie	0,818	0,562	0,215	0,274	0,341	0,220
R0	**Twarz**	0,381	0,072	0,468	0,424	0,422	0,260
	Przedramie	0,452	0,422	0,921	0,701	0,091	0,109
R2	**Twarz**	0,243	0,802	0,352	0,095	0,562	0,493
	Przedramie	0,381	0,588	0,054	0,399	0,062	**0,025***

SG – grupa badana, GC – grupa kontrolna, $\bar{x}$ – średnia, SD – odchylenie standardowe, BMI – wskaźniik masy ciała, TEWL – transepidermalna ucieczka wody, R0 – jędrność skóry, R2 – wiskoelastyczność skóry, * – wynik istotny statystycznie. I – pomiar przed 1. zabiegiem WBC; II – pomiar po 1. zabiegu WBC; III – pomiar przed 10. zabiegiem WBC; IV – pomiar po 10. zabiegu WBC; V – pomiar przed 20. zabiegiem WBC; VI – pomiar po 10. zabiegu WBC.

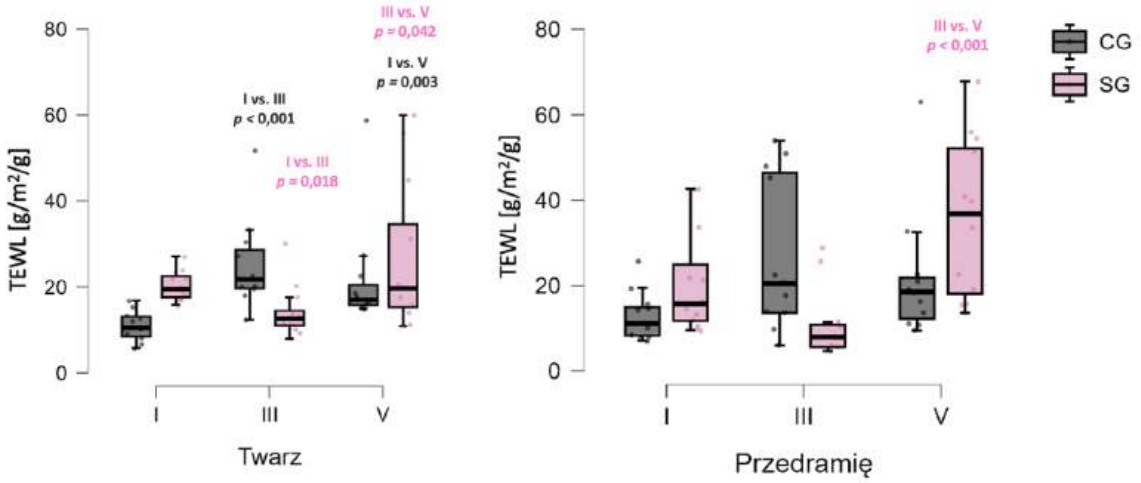
Dla zobrazowania wpływu serii zabiegów w kriokomorze na wybrane cechy skóry porównano między sobą wyniki wykonane przed 1. (I), 10. (III) i 20. (V) zabiegiem WBC. Wyniki pomiarów nawilżenia skóry twarzy i przedramion przedstawiono na rycinie 3. Analiza wyników pomiarów korneometrycznych twarzy wykazała istotne różnice dla interakcji czynników: czas i grupa (p = 0,028; ω^2 = 0,055; umiarkowana siła efektu). Wyniki na przedramieniu różniły się znamiennie w czasie (p = 0,002; ω^2 = 0,116; duża siła efektu). Odnotowano także istotną interakcję dla czynników: czas i grupa (p < 0,001; ω^2 = 0,139; duża siła efektu). Wyniki analizy post hoc wykazały, że nawilżenie na przedramieniu wzrosło u SG po pełnej, 4 tygodniowej serii w stosunku do pomiaru wyjściowego (p = 0,004; d = -1,500; bardzo duża siła efektu), przy czym nie odnotowano zmian między 1. a 10. zabiegiem, a dopiero między 10. a 20. zabiegiem (p = 0,002; d = -1,820; bardzo duża siła efektu).



Rycina 3.Pomiar nawilżenia [IU] skóry twarzy i przedramion w grupie osób otyłych lub z nadwagą (SG) i o prawidłowej masie ciała (CG) wykonany przed rozpoczęciem projektu (I), po serii 9 zabiegów (III) i 19 zabiegów (V) WBC

Wyniki pomiarów tewametrycznych przedstawiono na rycinie 4. Dla pomiarów wykonanych na twarzy wskazano istotne różnice w kolejnych pomiarach (p = 0,002; ω^2 = 0,124; duża siła efektu), wskazano także interakcję pomiar × grupa (p < 0,001; ω^2 = 0,287; bardzo duża siła efektu). Wyniki po pełnej serii zabiegowej różniły się istotnie od wyjściowych (p = 0,003; d = -0,970; duża siła efektu). Jednocześnie stan skóry po 9. i 19. zabiegach nie różnił się od siebie. Wyjściowo niższe wyniki obserwowano u CG (p < 0,001; d = 1,665; bardzo duża siła efektu), a w III punkcie pomiarowym u SG (p = 0,018; d = -1,448; bardzo duża siła efektu). W grupie osób z nadwagą i otyłością wskazano istotne różnice po 9. zabiegach (I vs. III: p = 0,018; d = 1,048; bardzo duża siła efektu), kiedy to obserwowano najniższe wyniki, a także po 19. zabiegach (III vs. V: p = 0,042; d = -1,346; bardzo duża siła efektu), gdzie wskazywano najwyższe wartości TEWL. Dla osób z prawidłową masą ciała wyjściowe wyniki różniły się od tych oznaczonych po 9 zabiegach (I vs. III: p < 0,001; d = -2,064; bardzo duża siła efektu) oraz po 19. zabiegach (I vs. V: p = 0,003; d = -1,640; bardzo duża siła efektu). Obie długości serii wywołały w tej grupie istotny wzrost TEWL.

Wyniki tewametrii na skórze przedramion były znamiennie różne w kolejnych pomiarach (p = 0,006; ω^2 = 0,132; umiarkowana/duża siła efektu), wskazano także interakcję pomiar × grupa (p < 0,001; ω^2 = 0,225; duża siła efektu). Wskazano, iż wyniki po 19. zabiegu były istotnie wyższe od wyjściowych (p = 0,028; d = -0,849; duża siła efektu) oraz tych oznaczonych po 9. zabiegach (p = 0,022; d = -0,928; duża siła efektu). W grupie badanej wskazano istotnie wyższe wyniki po pełnej, 4-tygodniowej serii zabiegów w porównaniu do wyników uzyskanych po 2 tygodniach (III vs. V: p < 0,001; d = -2,154; bardzo duża siła efektu).

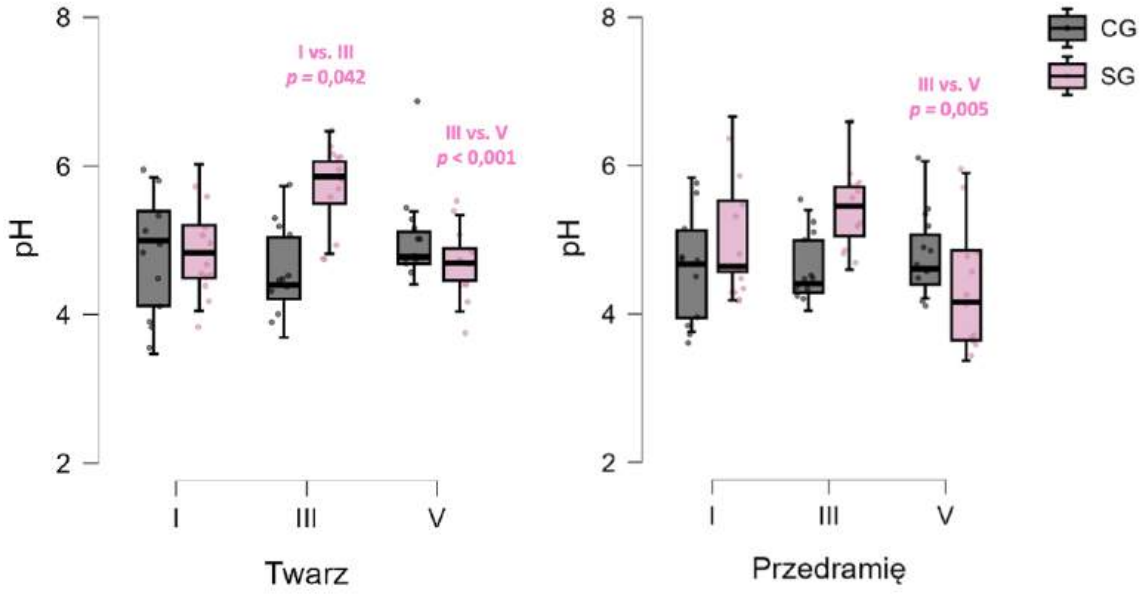


Rycina 4. Pomiar transepidermalnej ucieczki wody (TEWL) [g/m2/g] skóry twarzy i przedramion w grupie osób z otyłością lub nadwagą (SG) oraz osób w normowadze (CG) wykonane przed przystąpieniem do projektu (I), po serii 9 zabiegów (III) oraz 19 zabiegów (V) w kririokomorze

Wyniki pomiarów pH skóry przedstawiono na rycinie nr 5. Istotne różnice wskazano dla pomiarów zebranych na skórze twarzy dla interakcji pomiar x grupa (p < 0,001; ω^2 = 0,196; duża siła efektu). Testy post hoc wskazały istotnie wyższe wskazania dla SG po 9. zabiegach (I vs. III: p = 0,042; d = -1,325; duża siła efektu) z powrotnym spadkiem po kolejnych 2 tygodniach (III vs. V: p = 0,001; d = 1,709; duża siła efektu). Wskazano także, że grupa SG

inaczej zareagowała na serię 9. zabiegów niż CG i w pomiarze III wyniki SG były istotnie wyższe od CG (p = 0,003; d = 1,831; duża siła efektu).

Podobnie jak w przypadku pH skóry na twarzy, na przedramieniu istotne różnice wystąpiły dla interakcji pomiar x grupa (p = 0,007; ω^2 = 0,133; umiarkowana/duża siła efektu). Kierunki zmian dla obu grup bardzo przypominały to, co obserwowano na skórze twarzy. Odczyn kwasowo-zasadowy różnił się istotnie między grupami w połowie serii zabiegowej (p = 0,011; d = 1,354; duża siła efektu). Odnotowano obniżenie się pH u SG między 9. a 19. zabiegiem (III vs. V: p = 0,005; d = 1,757; duża siła efektu).

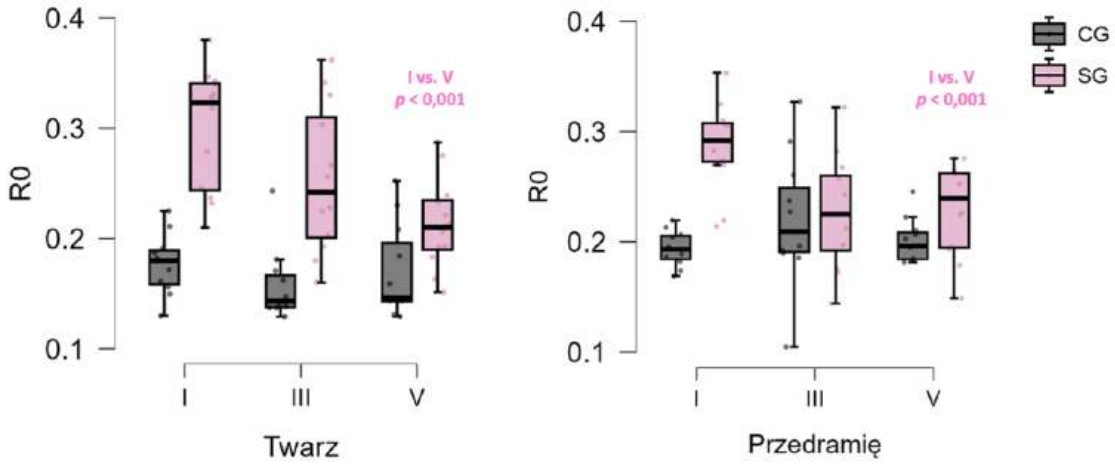


Rycina 5. Pomiar odczynu kwasowo-zasadowego (pH) skóry twarzy i przedramion w grupie osób z otyłością lub nadwagą (SG) oraz osób w normowadze (CG) wykonane przed przystąpieniem do projektu (I), po serii 9 zabiegów (III) oraz 19 zabiegów (V) w kriokomorze

Kutometryczna ocena jędrności skóry jest możliwa dzięki monitorowaniu wskaźnika R0. Jego zmiany w SG i CG przedstawiono na rycinie 6. Wskazano istotne różnice w czasie dla tego wskaźnika oceniane na twarzy (p = 0,001; ω^2 = 0,137; umiarkowana/duża siła efektu), wskazano także interakcję pomiar × grupa (p = 0,006; ω^2 = 0,096; umiarkowana siła efektu). Znamiennie niższe wyniki obserwowano po 19. zabiegu w porównaniu z wyjściowym pomiarem (I vs. V: p < 0,001; d = 0,995; duża siła efektu). Wskazano także istotne różnice pomiędzy SG a CG (p < 0,001; d = 1,865; bardzo duża siła efektu). Dokładniejsza analiza z uwzględnieniem tych dwóch czynników (pomiar i grupa) wskazała istotne różnice pomiędzy SG a CG w pomiarach: różnica wyjściowa (p < 0,001; d = 2,611; bardzo duża siła efektu) oraz po 9. zabiegach (p = 0,005; d = 2,061; bardzo duża siła efektu). Wyniki uzyskane po pełnej serii zabiegowej były zbliżone w obu grupach. Coś czego nie obserwowano dla uczestników o prawidłowych wartościach BMI to istotne spadki R0 po 19. zabiegach (I vs. V: p < 0,001; d = 1,839; bardzo duża siła efektu) w porównaniu z wartościami wyjściowymi. Spadek ten pozwolił ostatecznie, po 4-tygodniowej serii zabiegów, na uzyskanie wyników zbliżonych do tych, jakie obserwowano w grupie kontrolnej przez cały czas trwania projektu.

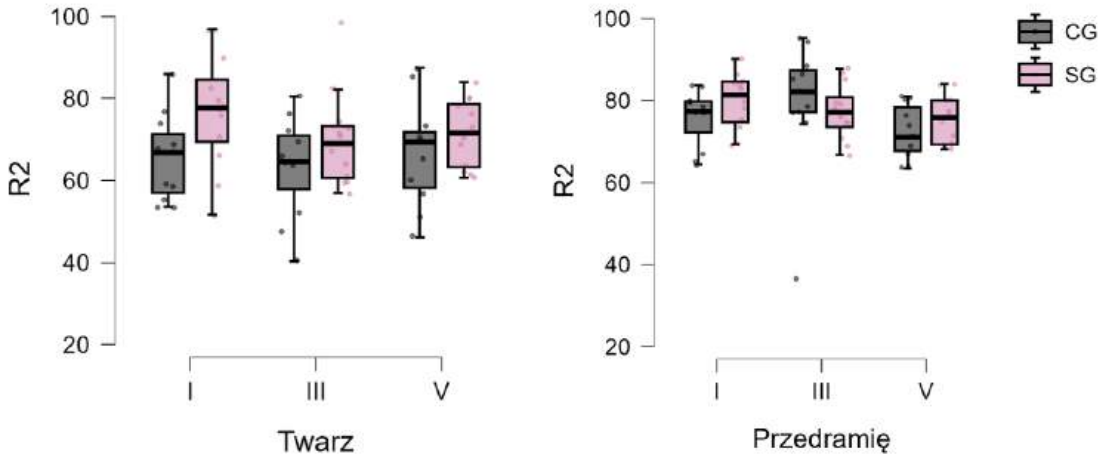
Dla skóry na przedramionach wskazano istotne różnice dopiero po uwzględnieniu grupy (interakcja: p = 0,004; ω^2 = 0,160; duża siła efektu). Czynnikiem różnicującym była także sama

zmienna: grupa ($p < 0{,}001$; $\omega^2 = 0{,}268$; bardzo duża siła efektu). W grupie z nadwagą i otyłością obserwowano istotny spadek R0 po 19. zabiegach (I vs. V: $p < 0{,}001$; d = 1,374; bardzo duża siła efektu).



Rycina 6.Pomiar kutometryczny (ocena jędrności, R0) skóry twarzy i przedramion w grupie osób z otyłością lub nadwagą (SG) oraz osób w normowadze (CG) wykonane przed przystąpieniem do projektu (I), po serii 9 zabiegów (III) oraz 19 zabiegów (V) w kriokomorze

Wyniki pomiarów kutometrycznych, tym razem pokazujące właściwości wiskoelastyczne skóry (R2), przedstawiono na rycinie 7. Wyniki dla twarzy i przedramienia nie różniły się między grupami w żadnym z punktów pomiarowych.



Rycina 7.Pomiar kutometryczny (ocena wiskoelastyczności, R2) skóry twarzy i przedramion w grupie osób z otyłością lub nadwagą (SG) oraz osób w normowadze (CG) wykonane przed przystąpieniem do projektu (I), po serii 9 zabiegów (III) oraz 19 zabiegów (V) w kriokomorze

Wyniki analizy korelacyjnej ujawniające współzmienność pomiędzy badanymi cechami biofizycznymi skóry oraz BMI przedstawiono w tabeli 5.

Tabela 5. Korelacje Spearmana

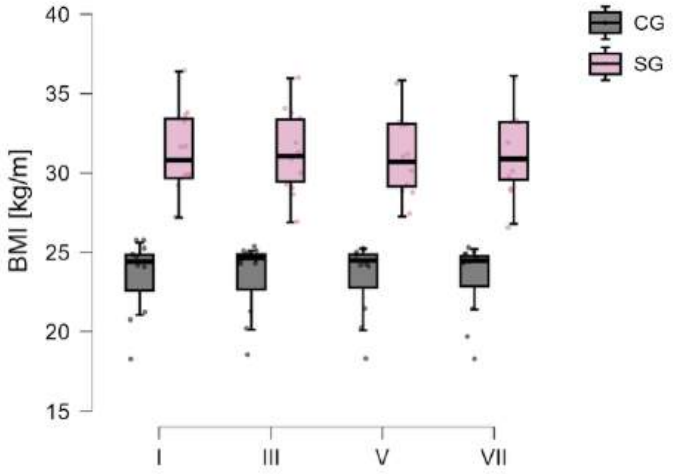
		Spearman's rho	***p***
Nawilżenie twarz	Nawilżenie przedramię	0,749	**< 0,001***
TEWL twarz	TEWL przedramię	0,453	**0,031***
pH twarz	pH przedramię	0,868	**< 0,001***
R0 twarz	R0 przedramię	0,793	**< 0,001***
Nawilżenie przedramię	R0 przedramię	-0,474	**0,022***
TEWL przedramię	R0 przedramię	0,409	0,054
TEWL twarz	R0 twarz	0,653	**< 0,001***
TEWL twarz	R2 twarz	0,492	**0,017***
TEWL twarz	BMI	0,758	**< 0,001***
R0 twarz	BMI	0,675	**< 0,001***
R0 przedramię	BMI	0,714	**< 0,001***

TEWL – transepidermalna ucieczka wody, R0 – jędrność skóry, R2 – wiskooelastyczność skóry, BMI – wskaźnik masy ciała, * – wynik istotny statystycznie

4.3. Wpływ WBC na cechy antropometryczne

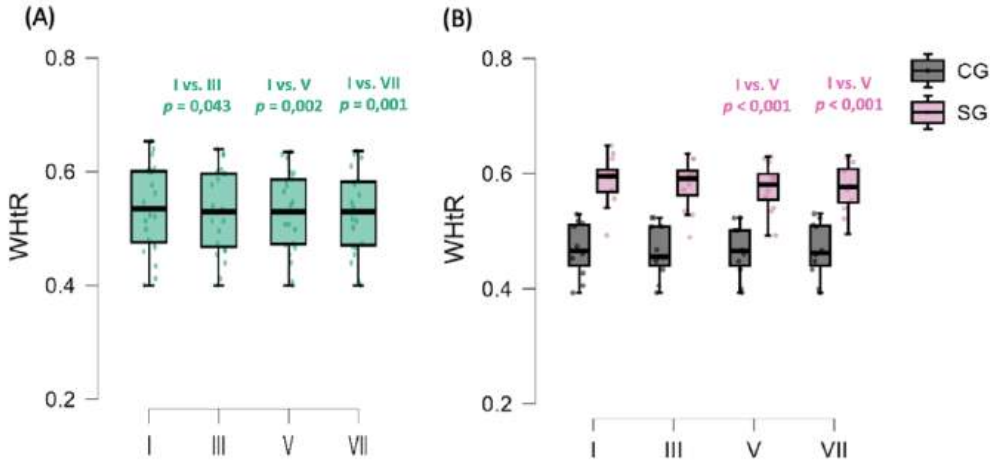
Jednym z uzupełniających elementów niniejszej dysertacji była ocena wpływu zabiegów kriostymulujących na zmiany składu ciała. Wyniki zostały przedstawione w artykule: *The effect of whole-body cryotherapy on the profile of selected adipokines and sirtuins in middle-aged individuals with varying degrees of body fatness,* wchodzącym w skład niniejszej dysertacji (**publikacja nr 6**).

Zastosowana interwencja nie miała istotnego wpływu na masę ciała uczestników badania. Wynik ANOVA wskazał istotne różnice dla BMI u SG ($p = 0,028$; $\omega^2 = 0,001$; bardzo mały efekt), jednak przeprowadzone testy post hoc nie ujawniły par wyników różniących się istotnie. Przed interwencją średni wynik dla SG wynosił 31,34; po zakończeniu interwencji 31,04, a po okresie 2 tygodni od jej kasacji: 31,21. Nie stwierdzono różnic w grupie CG (ryc. 8).



Rycina 8.Zmiany BMI w czasie w kolejnych pomiarach u osób o prawidłowym (CG) i podniesionym BMI (SG), wykonane przed przystąpieniem do projektu (I), po serii 9 zabiegów (III), po serii 19 zabiegów (V) w kriokomorze oraz 2 tygodnie po kasacji interwencji (VII)

Wykazano istotne różnice WHtR zarówno w czasie ($p < 0{,}001$; $\omega^2 = 0{,}004$; mały efekt), jak i dla interakcji: pomiar x grupa ($p = 0{,}010$; $\omega^2 = 0{,}002$; mała siła efektu). Zaobserwowano również efekt grupy ($p < 0{,}001$). Dalsze analizy wykazały istotne różnice między pomiarami I vs. III ($p = 0{,}043$; d = 0,107; mała siła efektu), I vs. V ($p = 0{,}002$; d = 0,149; mała siła efektu) i I vs. VII ($p = 0{,}001$; d = 0,180; mała siła efektu; ryc. 9A). Analizując grupy osobno, istotne zmiany zaobserwowano wyłącznie w SG między punktami czasowymi I i III ($p < 0{,}001$; d = 0,259; mała siła efektu) oraz między I i VII ($p < 0{,}001$; d = 0,293; mała siła efektu) wskazując, że wyniki po zakończeniu interwencji były istotnie niższe niż wyniki wyjściowe, a wyniki po 2 tygodniach od kasacji interwencji nadal wskazywały istotnie niższe wartości niż w wartość wyjściowa (ryc. 9B).

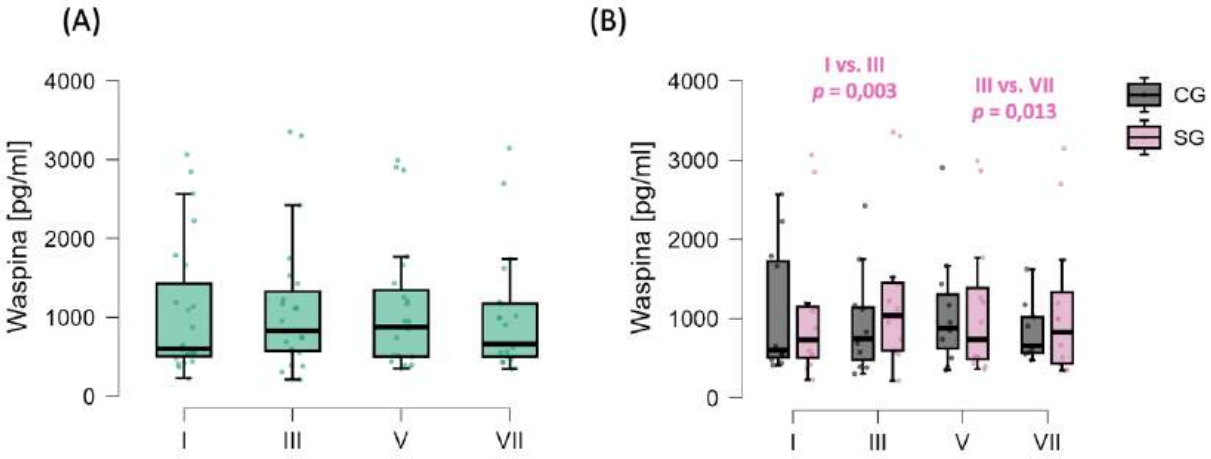


Rycina 9. Zmiany parametru WHtR w kolejnych pomiarach u wszystkich uczestników – wykres A oraz z podziałem na grupę o prawidłowym (CG) i podniesionym BMI (SG) – wykres B, wykonane przed przystąpieniem do projektu (I), po serii 9 zabiegów (III), po serii 19 zabiegów (V) w kriokomorze oraz 2 tygodnie po kasacji interwencji (VII)

4.4. Zmiany w stężeniach wybranych adipokin

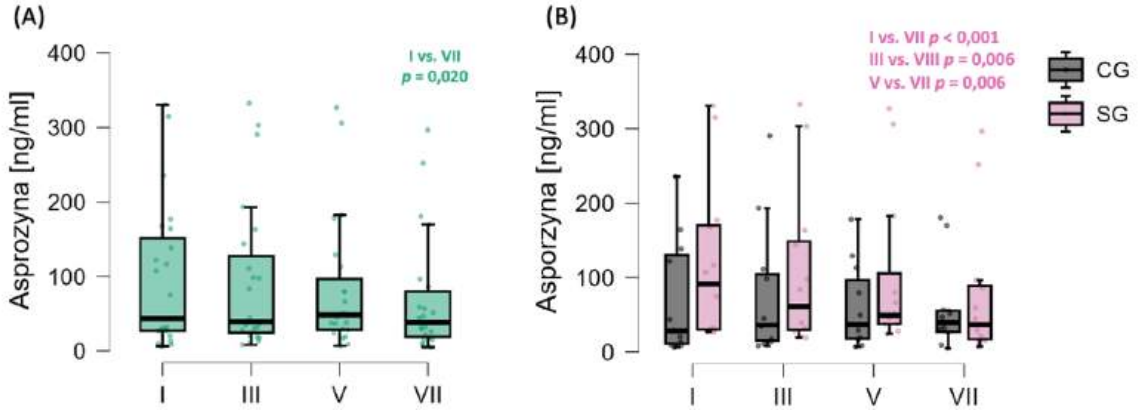
Zmiany stężeń adipokin były jednym z głównych celów badań. Wyniki zostały przedstawione w artykułach: *Effect of a series of whole-body cryostimulation treatments on vaspin levels in subjects with different body mass indexes* oraz *The effect of whole-body cryotherapy on the profile of selected adipokines and sirtuins in middle-aged individuals with varying degrees of body fatness,* wchodzących w skład niniejszej dysertacji (**publikacje nr 5 i 6**). Praca przeglądowa, która jest konsekwencją przygotowań do podjęcia się tego elementu badań doktorskich to: *Leptyna w otyłości - możliwości terapeutyczne* (**publikacja nr 3**).

Nie stwierdzono istotnych różnic między wyjściowymi stężeniami VASP w obu grupach. Brak różnic między grupą badaną a grupą kontrolną utrzymywał się w każdym punkcie pomiarowym. Stwierdzono różnicę na poziomie trendu ($p = 0{,}059$) po pierwszych dwóch tygodniach zabiegów (I vs. III; ryc. 10A). Dalsza analiza wykazała znaczącą zmianę stężenia VASP u SG ($p = 0{,}026$). Kolejne testy wykazały znaczący wzrost stężenia tej adipokiny w połowie serii ($p = 0{,}003$), a następnie spadek po serii 19. zabiegów (w zakresie trendu statystycznego: $p = 0{,}062$). Wyniki obserwowane dwa tygodnie po zakończeniu serii wskazywały na dalszy spadek stężenia adipokiny w porównaniu z drugim pomiarem (III vs. VII: $p = 0{,}013$). W grupie kontrolnej nie odnotowano istotnych różnic w żadnym z pomiarów czasowych (ryc. 10B).



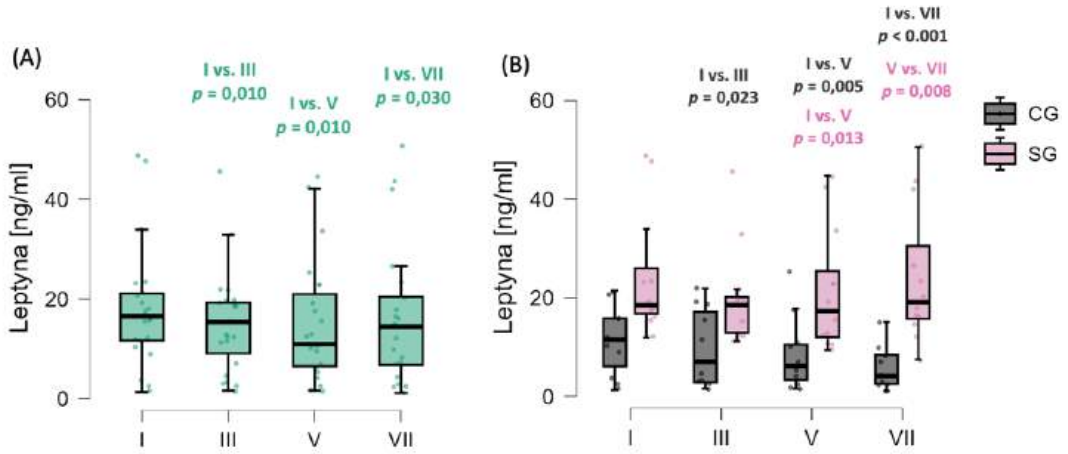
Rycina 10. Zmiany stężenia waspiny w kolejnych pobraniach u wszystkich uczestników – wykres A oraz z podziałem na grupę o prawidłowym (CG) i podnesionym BMI (SG) – wykres B, wykonanych przed przystąpieniem do projektu (I), po serii 9 zabiegów (III), po serii 19 zabiegów (V) w komorze oraz 2 tygodnie po kasacji interwencji (VII)

Wykazano różnicę między początkowym stężeniem ASP a stężeniem określonym 2 tygodnie po zakończeniu interwencji (I vs. VII: p = 0,020) (ryc. 11A). Dalsza analiza wykazała istotne zmiany jedynie w SG (p = 0,008). Pomiar wykonany 2 tygodnie po zakończeniu interwencji (VII) był istotnie niższy niż te wykonane w I. (p < 0,001), III. (p = 0,006) i V. (p = 0,006) punkcie pomiarowym (ryc. 11B).



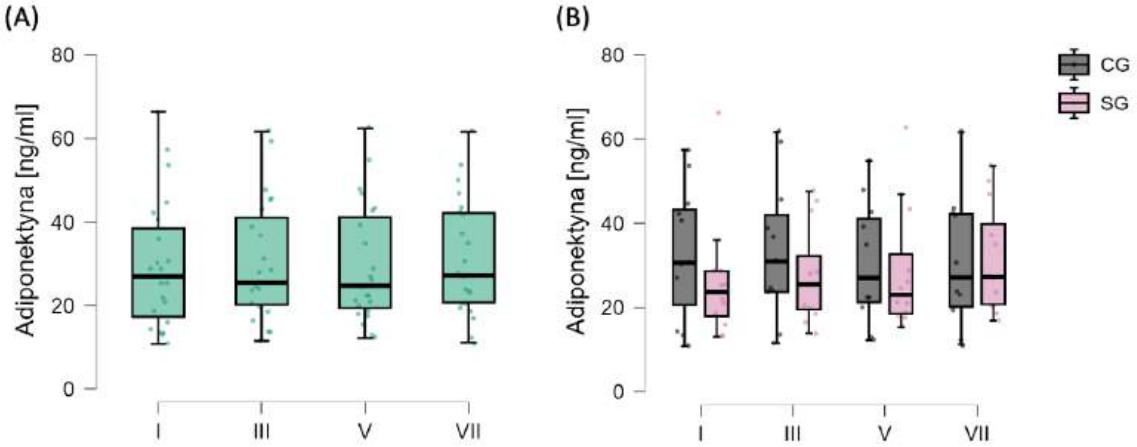
Rycina 11.Zmiany stężenia asprozyny w kolejnych pobraniach u wszystkich uczestników – wykres A oraz z podziałem na grupę o prawidłowym (CG) i podnesionym BMI (SG) – wykres B, wykonanych przed przystąpieniem do projektu (I), po serii 9 zabiegów (III), po serii 19 zabiegów (V) w kriokomorze oraz 2 tygodnie po kasacji interwencji (VII)

Stężenia LEP były znacznie wyższe u SG w każdym punkcie pomiarowym (I – p < 0,001; III – p = 0,017; V – p = 0,002; VII – p < 0,001 w stosunku do CG. Wskazano na wpływ czasu na stężenie LEP (p = 0,006). Największy spadek LEP podczas serii u SG zaobserwowano po zakończonej pełnej serii zabiegowej (p = 0,013). Dwa tygodnie po zakończeniu interwencji stężenie LEP u SG wzrosło (V vs. VII: p = 0,008). W grupie CG stężenie LEP spadło w połowie serii zabiegowej (p = 0,023) i po zakończeniu pełnej serii (p = 0,005) zabiegu, a tendencja spadkowa utrzymała się również 2 tygodnie po kasacji interwencji (I vs. VII: p = 0,002) (ryc. 12B).



Rycina 12.Zmiany stężenia leptyny w kolejnych pobraniach u wszystkich uczestników – wykres A oraz z podziałem na grupę o prawidłowym (CG) i podnesionym BMI (SG) – wykres B, wykonanych przed przystąpieniem do projektu (I), po serii 9 zabiegów (III), po serii 19 zabiegów (V) w kriokomorze oraz 2 tygodnie po kasacji interwencji (VII)

Nie wykazano istotnych zmian stężenia ADP w żadnej z badanych grup (ryc. 13).

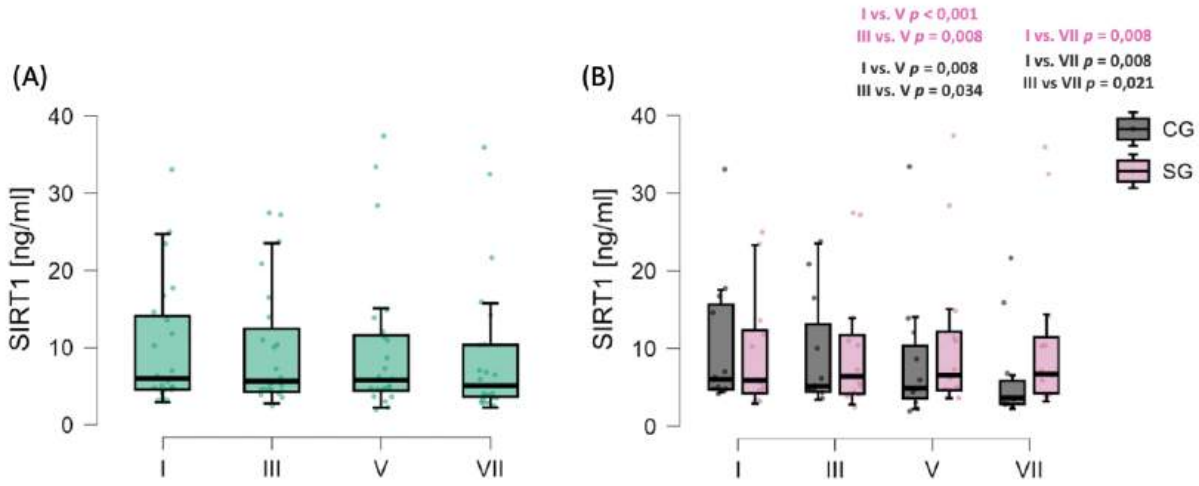


Rycina 13. Zmiany stężenia adiponektyny w kolejnych pobraniach u wszystkich uczestników – wykres A oraz z podziałem na grupę o prawidłowym (CG) i podniesionym BMI (SG) – wykres B, wykonanych przed przystąpieniem do projektu (I), po serii 9 zabiegów (III), po serii 19 zabiegów (V) w kriokomorze oraz 2 tygodnie po kasacji interwencji (VII)

4.5. Zmiany w stężeniach wybranych sirtuiny

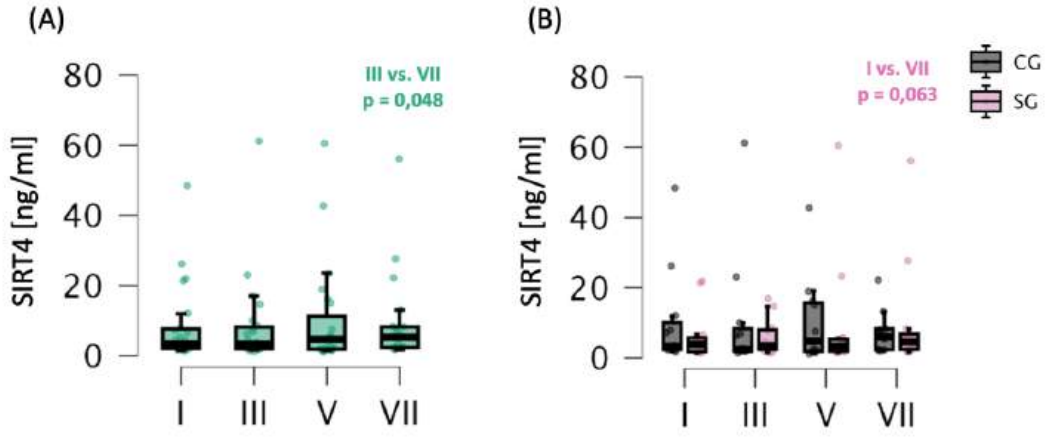
Ocena zmian stężeń sirtuin była priorytetowym celem badań niniejszej dysertacji. Wyniki zostały przedstawione w artykule: *The effect of whole-body cryotherapy on the profile of selected adipokines and sirtuins in middle-aged individuals with varying degrees of body fatness* (**publikacja nr 6**), wchodzącym w skład niniejszej dysertacji, a poszerzona analiza znaczenia sirtuin stała się podstawą kolejnej publikacji wchodzącej w zakres cyklu publikacyjnego: *The role of increased expression of sirtuin 6 in the prevention of premature aging pathomechanisms* (**publikacja nr 2**).

Sprawdzono wpływ standardowej serii zabiegów (10) i zwiększonej (20) na stężenie sirtuin. Wykazano różne zmiany dla SG i CG. W grupie SG odnotowano istotny wzrost SIRT1 (p = 0,006). Zmiany stężenia odnotowano po zakończeniu serii zabiegowej (I vs. V: p < 0,001) w porównaniu do pomiarów wykonywanych przed rozpoczęciem badań oraz między standardową (10 zabiegów) a zwiększoną (20 zabiegów) liczbą zabiegów (III vs. V: p = 0,008). Zmianę zaobserwowano również 2 tygodnie po kasacji interwencji w porównaniu do danych wyjściowych (I vs. VII: p = 0,008). W grupie CG zauważono spadek stężenia SIRT1 (p = 0,015), który odnotowano kolejno między punktami pomiarowymi I i V (p < 0,001) oraz III i V (p = 0,034). Różnica była również widoczna między pomiarem wykonywanym 2 tygodnie po kasacji interwencji i wyjściowym (I vs. VII: p = 0,005) oraz wykonywanym w połowie interwencji (III vs. VII: p = 0,021) (ryc. 14).



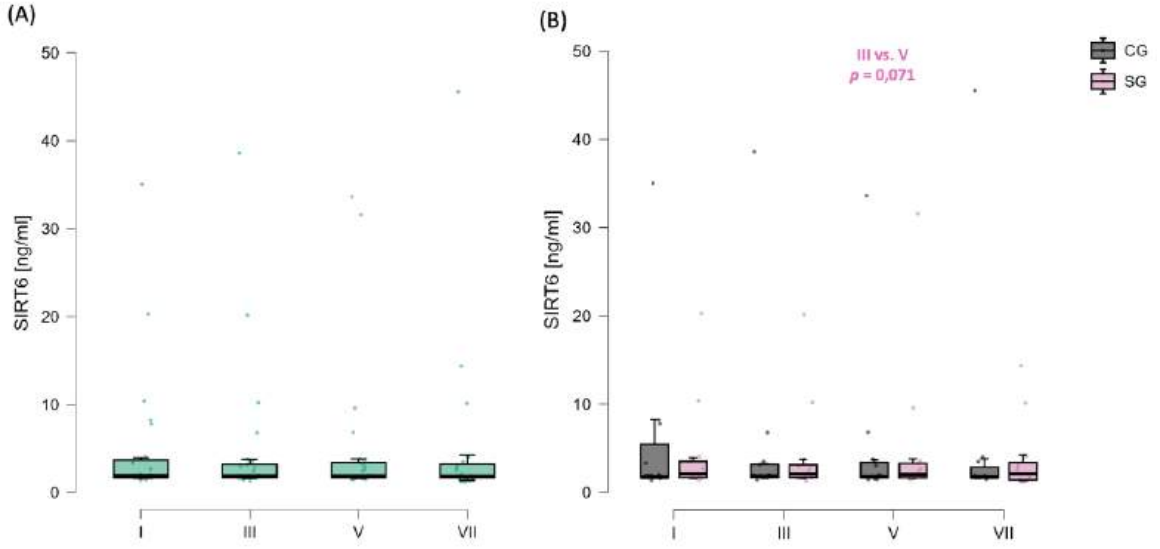
Rycina 14, Zmiany stężenia sirtuiny 1 w kolejnych pobraniach u wszystkich uczestników – wykres A oraz z podziałem na grupę o prawidłowym (CG) i podniesionym BMI (SG) – wykres B, wykonanych przed przystąpieniem do projektu (I), po serii 9 zabiegów (III), po serii 19 zabiegów (V) w kriokomorze oraz 2 tygodnie po kasacji interwencji (VII)

W porównaniu z drugim pomiarem odnotowano statystycznie istotny wzrost stężenie SIRT4 dwa tygodnie po zakończeniu serii zabiegów (III vs. VII: p = 0,048; ryc. 15A). Dalsza analiza wykazała, że zmiana była widoczna na poziomie tendencji statystycznej w grupie SG (I vs. VII: p = 0,063; ryc. 15B).



Rycina 15. Zmiany stężenia sirtuiny 4 w kolejnych pobraniach u wszystkich uczestników – wykres A oraz z podziałem na grupę o prawidłowym (CG) i podniesionym BMI (SG) – wykres B, wykonanych przed przystąpieniem do projektu (I), po serii 9 zabiegów (III), po serii 19 zabiegów (V) w kriokomorze oraz 2 tygodnie po kasacji interwencji (VII)

Podobną zależność odnotowano między drugim a trzecim punktem pomiarowym dla SIRT6, również w grupie SG (II vs III: p = 0,071). Nie osiągnięto jednak zakładanego progu istotności statystycznej. W grupie CG nie odnotowano żadnych istotnych zmian (ryc. 16).



Rycina 16. Zmiany stężenia sirtuiny 6 w kolejnych pobraniach u wszystkich uczestników – wykres A oraz z podziałem na grupę o prawidłowym (CG) i podniesionym BMI (SG) – wykres B, wykonanych przed przystąpieniem do projektu (I), po serii 9 zabiegów (III), po serii 19 zabiegów (V) w kriokomorze oraz 2 tygodnie po kasacji interwencji (VII)

4.6. Zmiany w metabolizmie węglowodanów

Zmiany w metabolizmie węglowodanów były jednym z uzupełniających elementów nieniejszych badań. Wyniki zostały przedstawione w artykule: *The effect of whole-body cryotherapy on the profile of selected adipokines and sirtuins in middle-aged individuals with varying degrees of body fatness,* wchodzącym w skład niniejszej dysertacji (**publikacja nr 6**).

Obie grupy objęte obserwacją mieściły się w wartościach referencyjnych dla wszystkich mierzonych wskaźników metabolizmu węglowodanów (tab. 6). Pomimo tego, stwierdzono istotne różnice pomiędzy wyłonionymi grupami i wyższe wartości wyjściowe stężenia insuliny (p = 0,002; d = 0,773, umiarkowana siła efektu) w SG.

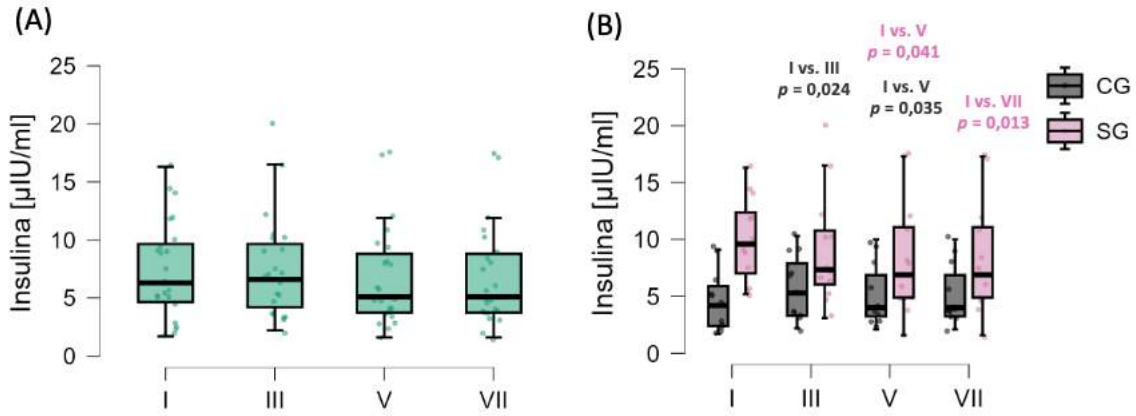
Tabela 6. Charakterystyka wartości wyjściowych metabolizmu węglowodanów

	Wartości referencyjne	**SG**		**CG**		***p***
		$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	**SG vs. CG**
Insulina [µIU/ml]	3 - 17	10,01	3,73	4,55	2,67	**0,002***
FBG [mmol/l]	3,9 - 5,5	5,39	0,53	4,90	0,49	0,876
Fruktozamina [µmol/l]	205 - 285	241,33	19,63	242,91	10,13	1,000
HbA1c [mmol/mol]	20 - 42	38,92	2,91	36,73	3,72	0,190

SG – grupa badana, GC – grupa kontrolna, $\bar{x}$ - średnia, SD – odchylenie standardowe, * – wynik istotny statystycznie.

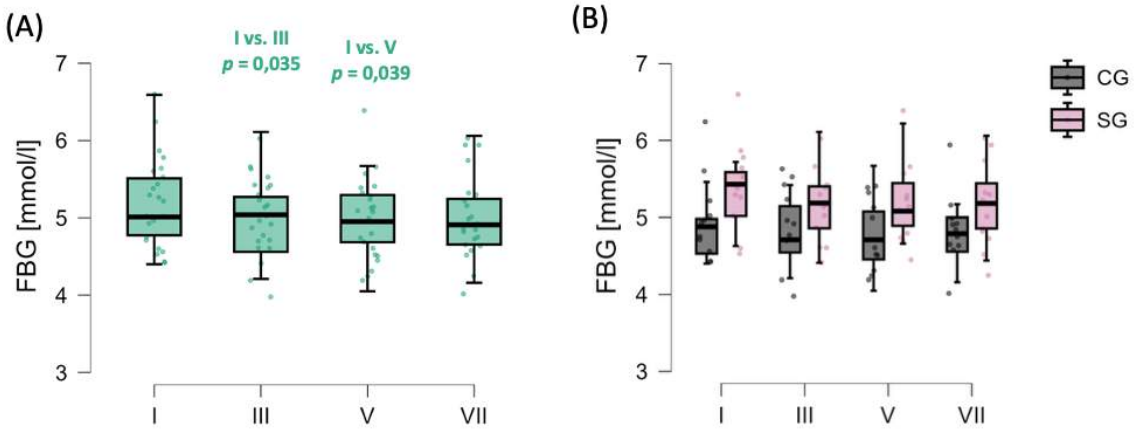
Seria WBC spowodowała istotne obniżenie stężenia insuliny w SG (I vs. V: p = 0,041; I vs. VII: p = 0,013). W CG stwierdzono wzrost stężenia insuliny po 9. zabiegach (I vs. III: p =

0,024), a następnie spadek po zakończeniu serii zabiegów (III vs. V: p = 0,035) (ryc. 17). Na każdym etapie oznaczane wartości mieściły się w zakresie wartości referencyjnych.



Rycina 17. Zmiany stężenia insuliny w kolejnych pobraniach u wszystkich uczestników – wykres A oraz z podziałem na grupę o prawidłowym (CG) i podniesionym BMI (SG) – wykres B, wykonanych przed przystąpieniem do projektu (I), po serii 9 zabiegów (III), po serii 19 zabiegów (V) w kriokomorze oraz 2 tygodnie po kasacji interwencji (VII)

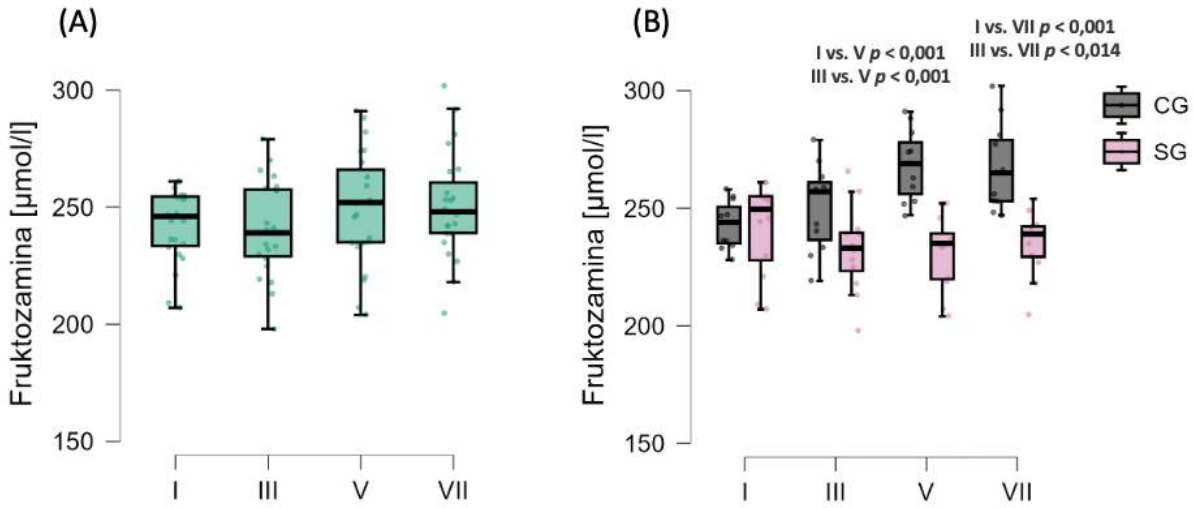
Stężenia FBG ulegały istotnym zmianom w trakcie trwania projektu (I vs. III: p = 0,035; d = 0,376, mała siła efektu; I vs. V: p = 0,039; d = 0,352, mała siła efektu; ryc.18A) odpowiednio w pomiarach przed 10. i 20. zabiegiem w porównaniu z pomiarami wyjściowymi (ryc. 18). Zaobserwowano również efekt grupowy (p = 0,043; ω^2 = 0,076; umiarkowana siła efektu) z istotnie wyższymi wynikami dla SG.



Rycina 18. Zmiany stężenia FBG w kolejnych pobraniach u wszystkich uczestników – wykres A oraz z podziałem na grupę o prawidłowym (CG) i podniesionym BMI (SG) – wykres B, wykonanych przed przystąpieniem do projektu (I), po serii 9 zabiegów (III), po serii 19 zabiegów (V) w kriokomorze oraz 2 tygodnie po kasacji interwencji (VII)

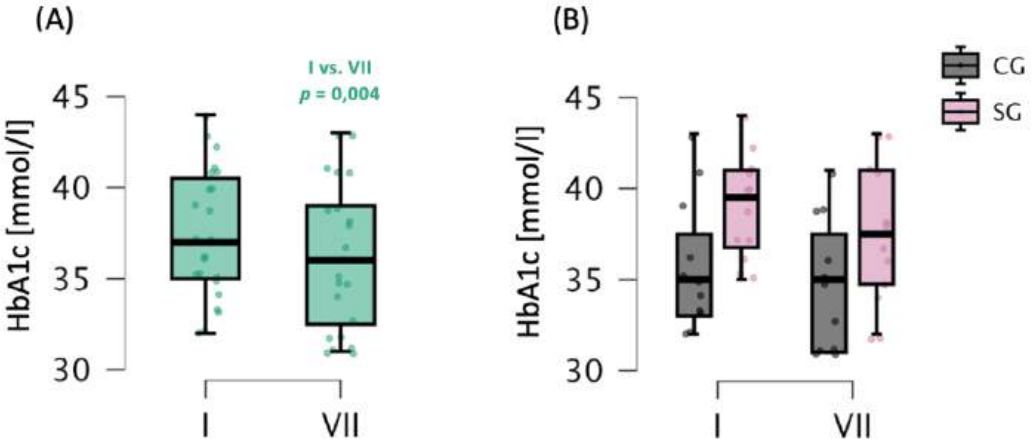
Dwa markery, które dają wgląd w długoterminową kontrolę glikemii wprowadzone do badań własnych: fruktozamina (p < 0,001; ω^2 = 0,061; umiarkowana siła efektu) i HbA1c (p = 0,004; ω^2 = 0,004; znikoma siła efektu), również istotnie zmieniły stężenia w czasie objętym obserwacją. Dla fruktozaminy zaobserwowano również istotny wpływ grupy (p = 0,001; ω^2 = 0,225; duża siła efektu). Analiza post hoc wykazała, że istotny wpływ czasu wystąpił u CG między pomiarem wyjściowym, a po zakończonej serii zabiegowej (I vs. V: p <

0,001; d = 1,543; bardzo duża siła efektu) oraz po kasacji interwencji (I vs. VII: $p < 0,001$; d = -1,477; bardzo duża siła efektu). Wskazano również różnicę między pomiarem wykonywanym w połowie serii a tym po zakończonej (III vs. V: $p < 0,001$; d = -1,108; duża siła efektu) oraz 2 tygodnie po kasacji (III vs. VII: $p < 0,014$; d = -1,042; duża siła efektu). Istotną różnicę w stężeniu fruktozaminy między grupami zaobserwowano również w V punkcie pomiarowym ($p < 0,001$) i VII ($p = 0,003$) (ryc. 19).



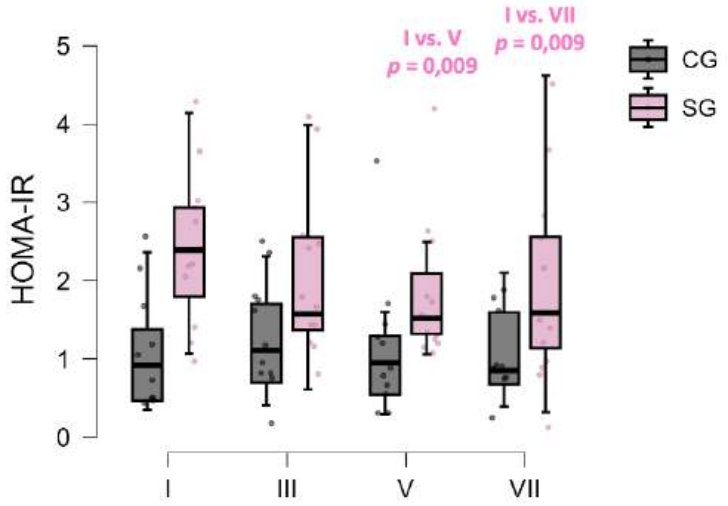
Rycina 19. Zmiany stężenia fruktozaminy w kolejnych pobraniach u wszystkich uczestników – wykres A oraz z podziałem na grupę o prawidłowym (CG) i podniesionym BMI (SG) – wykres B, wykonanych przed przystąpieniem do projektu (I), po serii 9 zabiegów (III), po serii 19 zabiegów (V) w kriokomorze oraz 2 tygodnie po kasacji interwencji (VII)

Stężenie HbA1c różniło się istotnie pomiędzy pomiarem wyjściowym a pomiarem wykonanym 2 tygodnie po zakończeniu interwencji (I vs. VII $p = 0,004$; ryc. 25). Nie wskazano tu efektu grupy (ryc. 20).



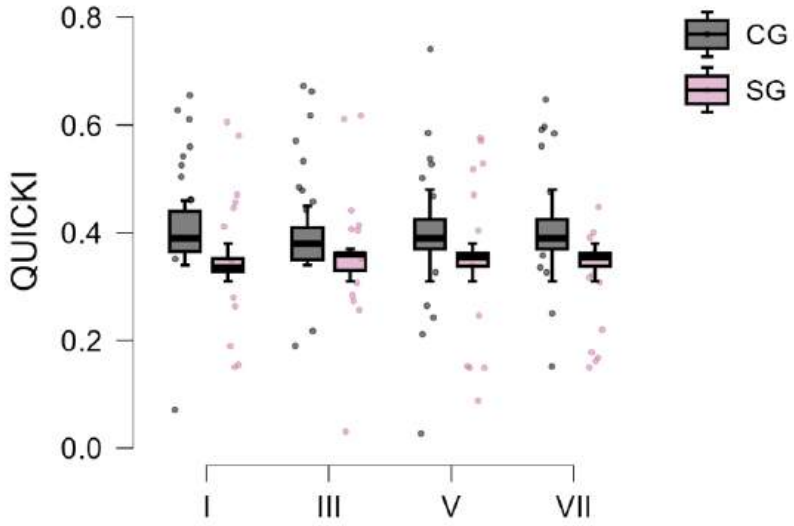
Rycina 20. Zmiany stężenia hemoglobiny glikowanej w kolejnych pobraniach u wszystkich uczestników – wykres A oraz z podziałem na grupę o prawidłowym (CG) i podniesionym BMI (SG) – wykres B, wykonanych przed przystąpieniem do projektu (I), po serii 9 zabiegów (III), po serii 19 zabiegów (V) w kriokomorze oraz 2 tygodnie po kasacji interwencji (VII)

Wyższe wartości HOMA-IR odnotowano u SG przed rozpoczęciem serii zabiegowej ($p < 0{,}001$) i po zakończonej pełnej serii ($p = 0{,}012$) w stosunku do CG. Zaobserwowano zmianę indeksu HOMA-IR w czasie dla SG ($p = 0{,}032$). Dalsza analiza wykazała istotny spadek indeksu po 19. zabiegach WBC (I vs. V: $p = 0{,}009$). Efekt ten utrzymywał się po 2 tygodniach od kasacji interwencji (I vs. VII: $p = 0{,}009$) (ryc. 21).



Rycina 21. Zmiany HOMA-IR w czasie w kolejnych pomiarach u osób o prawidłowym (CG) i podniesionym BMI (SG), wykonane przed przystąpieniem do projektu (I), po serii 9 zabiegów (III), po serii 19 zabiegów (V) w kriokomorze oraz 2 tygodnie po kasacji interwencji (VII)

Wyższe wartości parametrów wyjściowych dla indeksu QUCIKI odnotowano w CG stosunku do SG ($p = 0{,}010$; d = 1,630), a także istotną różnicę dla interakcji: pomiar x grupa ($p = 0{,}007$; $\omega^2 = 0{,}027$). Zaobserwowano również efekt grupowy ($p = 0{,}010$; $\omega^2 = 0{,}140$, duża siła efektu) ze znamiennie wyższymi wartościami dla CG (Ryc. 22).



Rycina 22. Zmiany QUICKI w czasie w kolejnych pomiarach u osób o prawidłowym (CG) i podniesionym BMI (SG), wykonane przed przystąpieniem do projektu (I), po serii 9 zabiegów (III), po serii 19 zabiegów (V) w kriokomorze oraz 2 tygodnie po kasacji interwencji (VII)

W tabeli 7. wskazano istotne korelacje pomiędzy badanymi parametrami dotyczącymi markerów biochemicznych obrazujących metabolizm węglowodanów i lipidów.

Tabela 7. Korelacje markerów biochemicznych obrazujących metabolizm węglowodanów i lipidów

		Przed rozpoczęciem serii zabiegowej		**W połowie serii zabiegowej**		**Po zakończeniu serii zabiegowej**		**2 tygodnie po kasacji interwencji**	
		r_p	*p*	r_p	*p*	r_p	*p*	r_p	*p*
BMI	LEP	0,560	**0,002***	0,459	**0,024***	0,532	**0,010***	0,564	**0,009***
	WHR	0,626	**< 0,001***	0,587	**0,003***	0,585	**0,004***	0,606	**0,003***
	WHtR	0,893	**< 0,001***	0,869	**< 0,001***	0,878	**< 0,001***	0,907	**< 0,001***
	HOMA-IR	0,529	**0,009***	-	-	0,494	**0,017***	-	-
	QUICKI	-0,535	**0,009***	-	-	-0,533	**0,009***	-	-
	Insulina	0,542	**0,008***	-	-	0,445	**0,003***	-	-
	Fruktozamina	-	-	-	-	-0,690	**< 0,001***	-0,582	**0,004***
LEP	WHtR	0,474	**0,015***	0,493	**0,014***	0,549	**0,007***	0,521	**0,017***
	HOMA-IR	0,617	**0,002***	-	-	0,464	**0,026***	0,533	**0,009***
	QUICKI	-0,635	**0,001***	-	-	-0,489	**0,018***	-0,546	**0,010***
	Insulina	0,636	**0,001***	-	-	0,462	**0,026***	-0,538	**0,012***
	Fruktozamina	-	-	-0,537	**0,008***	-0,596	**0,003***	-0,837	**< 0,001***
	FBG	-	-	-	-	-	-	0,485	**0,026***
WHR	HOMA-IR	0,543	**0,007***	-	-	0,565	**0,005***	0,425	**0,048***
	QUICKI	-0,546	**0,007***	-0,462	**0,026***	-0,572	**0,004***	-	-
	FBG	0,459	**0,027***	-	-	0,466	**0,025***	-	-
	Insulina	0,535	**0,009***	-	-	0,514	**0,012***	-	-
	HbA1c	0,471	**0,031***	-	-	-	-	0,484	**0,042***
	Fruktozamina	-	-	-	-	-0,461	**0,027***	-	-
WHtR	HOMA-IR	0,656	**<0,001***	0,500	**0,015***	0,592	**0,003***	0,507	**0,016***
	QUICKI	-0,662	**<0,001***	-0,469	**0,024***	-0,623	**0,002***	-0,497	**0,018***
	FBG	0,611	**0,002***	0,457	**0,028***	0,539	**0,008***	0,491	**0,020***
	Insulina	0,649	**<0,001***	0,424	**0,044***	0,537	**0,008***	0,452	**0,035***
	Fruktozamina	-	-	-0,471	**0,023***	-0,719	**< 0,001***	-0,621	**0,002***
	SIRT1	-	-	-	-	-	-	0,442	**0,041***
HOMA-IR	ADP	-0,539	**0,008***	-	-	-0,495	**0,016***	-	-
	Fruktozamina	-	-	-	-	-0,464	**0,026***	-0,498	**0,016***
QUICKI	ADP	0,516	**0,012***	-	-	0,474	**0,022***		
	Fruktozamina	-	-	-	-	0,476	**0,022***	0,474	**0,022***
Insulina	ADP	-0,507	**0,014***	-	-	-0,512	**0,013***		
	Fruktozamina	-	-	-	-	-	-	-0,503	**0,014***
FBG	Insulina	0,568	**0,005***	-	-	0,494	**0,016***	0,638	**0,001***

BMI – wskaźnik masy ciała, LEP – leptyna, WHR – wskaźnik proporcji obwodu talii do obwodu bioder, WHtR – wskaźnik proporcji obwodu talii do wysokości ciała, HOMA-IR - model homeostazy do oceny insulinooporności, QUICKI – indeks ilościowej oceny wrażliwości na insulinę, FBG – glukoza na czczo, HbA1c – hemoglobina glikozylowana A1c, ADP – adiponektyna, r_p - współczynnik Spearmana, * – wynik istotny statystycznie.

5. Dyskusja

Wraz ze wzrostem popularności zimowych kąpieli wodnych i stosowania zabiegów kriostymulacji, obserwuje się wzrost badań dotyczących wpływu temperatur kriogenicznych na organizm człowieka. Badania te obejmują między innymi powłokę zewnętrzną – skórę [13,93,94], która jest pierwszym narządem mającym kontakt z zimnem, oraz tkankę tłuszczową [95], powłokę wewnętrzną stanowiącą izolator, który ogranicza wpływ temperatur kriogenicznych na wnętrze ciała. Oprócz funkcji izolującej, tkanka tłuszczowa pod wpływem niskich temperatur uwalnia również szereg specyficznych czynników, które również stanowią przedmiot wielu badań [25].

Obecnie, otyłość uznawana jest za przewlekłą, nawracającą i wieloczynnikową chorobę. Towarzyszą jej zaburzenia metaboliczne i inne powiązane choroby współistniejące. Stopniowo zagraża niemal każdemu układowi narządów [96]. Większość niechirurgicznych zaleceń, dotyczących redukcji masy ciała wiąże się z trudnością w zapewnieniu klinicznie istotnej utraty masy ciała [84]. Dane literaturowe wskazują, że WBC staje się obiecującą interwencją wspomagającą w leczeniu otyłości. Korzystne efekty kriostymulacji obejmują zmniejszenie masy ciała, otyłości brzusznej oraz nasilenia stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego [24,97]. Niniejsze badania wskazały pozytywny efekt zabiegów kriostymulacji ogólnoustrojowej na metabolizm węglowodanów, stężenie LEP i ASP, SIRT1 i SIRT4 oraz wskaźnik WHtR, a także elastyczność skóry i nawilżenie warstwy rogowej naskórka.

Skuteczność WBC w niwelowaniu patologicznych zmian wynikających z otyłości może wynikać z szeregu czynników. Jak wskazały badania innych autorów, przewlekła ekspozycja na zimno prowadzi do wzrostu aktywności i objętości BAT, inicjując procesy termogenezy bezdrżeniowej w celu utrzymania stałej temperatury ciała, co prowadzi do zwiększenia wydatku energetycznego [98]. Wskazano, że 10-dniowy protokół aklimatyzacji do zimna (15–16°C) zwiększa aktywność BAT wraz ze wzrostem termogenezy bezdrżeniowej. Proces ten skutkował subiektywnym odczuciem zwiększonego komfortu w zimnym otoczeniu i mniejszym drżeniem [99].

Z drugiej strony, Weiner i wsp. [100] w badaniach w modelu zwierzęcym odnotowali wzrost ekspresji genu VASP w aktywowanym zimnem BAT. Chociaż ekspresja mRNA była zwiększona, stężenie VASP w osoczu były obniżone po ekspozycji na zimno. Nawiązując do funkcji endokrynologicznych VASP [68,69,101], zwiększona ekspresja docelowych proteaz serynowych w wyniku ekspozycji na zimno może zwiększać zużycie VASP, ponieważ łączy się ona z hamowanym enzymem nieodwracalnie, i skutkować niższym stężeniem tej adipokiny we krwi [100,102]. W niniejszym badaniu, w grupie osób z prawidłowym BMI nie zaobserwowano istotnych zmian dotyczących stężenia VASP. W SG początkowo nastąpił znaczny wzrost stężenia VASP, co mogło być związane z aktywacją tkanki tłuszczowej w odpowiedzi na zimno. We wcześniejszych badaniach wskazano, że wpływ zabiegów niskotemperaturowych na organizm człowieka zależy od składu ciała, który najprawdopodobniej jest związany z grubością podskórnej tkanki tłuszczowej działającej jako izolator termiczny [24,25]. I chociaż zaobserwowane zmiany były statystycznie nieistotne, dynamika zmian w grupie CG różniła się od tej w grupie SG.

Po kolejnych 10 zabiegach nastąpił istotny spadek stężenia VASP. Może to być wyrazem adaptacji organizmu do stymulacji kriogenicznej, która nastąpiła z czasem, lub, jak sugerowali wcześniejsi autorzy [100], konsekwencją wzrostu aktywności lub ekspresji jej docelowych proteaz serynowych. pod wpływem temperatur kriogenicznych. W obecnym projekcie wpływ

zaproponowanej interwencji na wielkości wskaźnika BMI wskazano wyłącznie w grupie z zaburzonymi jego wartościami (SG). Wcześniejsze badanie wykazało redukcję tkanki tłuszczowej po serii 20 zabiegów WBC [95]. Spadek stężenia VASP obserwowany po 19. zabiegu, który utrzymywał się dalej w pomiarze wykonanym 2 tygodnie po kasacji interwencji, mógł być ściśle związany ze spadkiem zawartości tkanki tłuszczowej w organizmie obserwowanym we wcześniejszych badaniach Więcek i wsp. [95] u osób otyłych poddanych zabiegom WBC. Spadek VASP mógł być też związany ze zwiększoną ekspresją genu kodującego waspinę i późniejszym wykorzystaniem tego białka opisanymi wcześniej w literaturze [100].

Wyniki badań dotyczących stężeń VASP u osób otyłych i szczupłych są rozbieżne. W niniejszym badaniu zauważono, że u osób o prawidłowej masie ciała stężenia VASP były niższe niż w grupie otyłej przez cały okres badania, ale nie stwierdzono istotnych korelacji między stężeniami VASP a BMI w żadnym z punktów pomiarowych, które potwierdzałyby związek między tymi parametrami. Korner i wsp. [103] również nie odnotowali korelacji między BMI a stężeniami VASP w surowicy, ale w ich przypadku zaobserwowano odwrotną zależność niż w badaniu własnym – osoby otyłe charakteryzowały niższe stężenia VASP w surowicy. Z drugiej strony, niektórzy autorzy zauważają również dymorfizm płciowy w odniesieniu do wartości stężenia krążącego VASP w surowicy. W literaturze wskazuje się na wyższe stężenia u kobiet w porównaniu z mężczyznami [70,103]. Choi i wsp. [104] wskazali na dodatnią korelację między stężeniami VASP w osoczu a BMI u mężczyzn, ale zależność ta nie została stwierdzona u kobiet. Obie grupy uczestniczące w niniejszym badaniu składały się zarówno z mężczyzn, jak i kobiet, co w kontekście przytoczonych danych literaturowych mogło mieć wpływ na uzyskane wyniki. Dalsze badania obejmujące osoby o większej zmienności BMI i płci mogłyby dostarczyć więcej informacji na ten temat.

Podobnie jak w badaniach przeprowadzonych przez Więcek i wsp. [61], niniejsze badanie również wykazało istotne obniżenie stężenia ASP w odpowiedzi na zastosowaną interwencję w postaci serii zabiegów WBC. Adipokina ta, wydzielana przez WAT, moduluje szybkie uwalnianie glukozy z wątroby [105]. Romere i wsp. [59] wskazali, że u otyłych mężczyzn z insulinoopornością jej stężenie jest patologicznie podwyższone. Zaobserwowali podobny wzrost w dwóch niezależnych mysich modelach insulinooporności (otyłość indukowana dietą i genetyczny model otyłości ob/ob). U otyłych myszy z insulinoopornością efekt obniżający stężenie insuliny został osiągnięty poprzez immunosekwestrację ASP [59]. Mimo, iż w obecnym badaniu nie wskazano żadnych korelacji pomiędzy ASP a innymi mierzonymi parametrami, to zaobserwowano istotne obniżenie stężenia ASP w grupie SG, któremu towarzyszyło obniżenie wskaźnika insulinooporności HOMA-IR. Dane te są zgodne z wynikami przedstawionymi przez Romere i wsp. [59].

Korelacje odnotowano natomiast pomiędzy innymi adipokinami powiązanymi z otyłością - LEP i ADP. Stężenia LEP w surowicy korelowały dodatnio z BMI, WHtR, HOMA-IR oraz insuliną i FBG (jednak wyłącznie w pomiarze wykonanym 2 tygodnie po kasacji interwencji) oraz ujemnie z QUICKI i stężeniem fruktozaminy. Z kolei stężenia ADP korelowały ujemnie ze stężeniem insuliny i HOMA-IR oraz dodatnio z QUICKI. Niniejsze badanie potwierdza wcześniejsze ustalenia innych autorów - wyższe stężenie LEP [50] i niższe stężenie ADP [52] odnotowuje się u osób z nadwagą i otyłością.

Kozłowska i wsp. [67] wykazali, że seria 10 zabiegów WBC spowodowała wzrost stężenia ADP. W badaniu wzięło udział dwudziestu dwóch mężczyzn (wiek: 40 ± 13,5 lat), a wzrostowi ADP w osoczu towarzyszył spadek insuliny i FBG. Badanie to nie wykazało wyjściowych różnic w stężeniach ADP między grupami, a ADP skorelowana była ujemnie jedynie ze stężeniem insuliny w surowicy. Nie wykazano korelacji między FBG a ADP, dlatego

można wnioskować, że obserwowany istotny spadek FBG nie był związany ze wzrostem ADP, ale z ogólną poprawą parametrów metabolizmu węglowodanów. W niniejszym badaniu nie zaobserwowano jednak żadnych zmian w stężeniu ADP. Podobnie w badaniach innych autorów - nie zaobserwowano zmian w stężeniu ADP po zastosowaniu bodźca kriogenicznego: ani w monoterapii [25,106], ani w połączeniu WBC i ćwiczeń aerobowych [107].

Dotychczasowe badania dotyczące wpływu temperatur kriogenicznych na stężenie leptyny przynoszą niejednoznaczne wyniki, co wskazuje na potrzebę dalszych analiz w tym zakresie. Pilch i wsp. [25] poddali osoby z nadwagą i otyłością serii 20 zabiegów WBC. Autorzy donieśli, że pomiędzy 10 a 20 sesjami WBC nastąpiło istotne obniżenie stężenia LEP w surowicy. Badania te sugerują, że w przypadku osób otyłych liczba zabiegów powinna być zwiększona, powyżej standardowo stosowanej liczby 10. Dane te są zgodne z wynikami niniejszego badania: w CG istotny spadek odnotowano po 10. zabiegu, ale w SG dopiero po serii 20. zabiegów. Ptaszek i wsp. [108] wskazali na spadek stężenia LEP po serii 20 zabiegów WBC, ale wyłącznie u mężczyzn; u kobiet nastąpił wzrost LEP. Lubkowska i wsp. [107] ocenili wpływ sześciomiesięcznego programu ćwiczeń z dwoma ekspozycjami na WBC w 20 sesjach na zmiany między innymi LEP i ADP u osób otyłych. Nie zaobserwowali jednak zmian w stężeniu tych adipokin. Również Więcek i wsp. [95] nie zaobserwowali zmian w stężeniach LEP u kobiet w okresie menopauzy z zaburzeniami metabolicznymi poddanych serii 20 zabiegów WBC. W niniejszym badaniu seria zabiegów WBC przyczyniła się do znaczącego obniżenia stężenia LEP w obu grupach, ale analiza wyników uzyskanych dwa tygodnie po zakończeniu interwencji ujawniła różnicę między grupami: w CG utrzymywał się trend spadkowy, podczas gdy w SG zaobserwowano istotny wzrost stężeń LEP. Wyżej wymienione badania wskazują, że kierunki zmian LEP mogą zależeć od płci, stopnia otłuszczenia organizmu czy występowania chorób współistniejących, co należy uwzględnić w przyszłych projektach.

Tang i wsp. [109] zwrócili uwagę na związek między SIRT6 a LEP. Wskazali, że SIRT6 jest istotnym regulatorem homeostazy energetycznej, który promuje ujemny bilans energetyczny i może modulować sygnalizację LEP. Niedobór SIRT6 prowadzi do osłabienia indukowanej leptyną fosforylacji białka STAT3 (ang. *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) i zaburzenia sygnalizacji leptynowej. Niniejsze badanie wykazało ujemną korelację między stężeniami w surowicy SIRT6 a LEP, co potwierdza wcześniejsze odkrycia. Nie stwierdzono jednak żadnych zmian w stężeniu SIRT6 ani różnic między grupami. W badaniu Kuang i wsp. [110] zauważono, że u osób z otyłością występuje zmniejszona ekspresja SIRT6 w tkance tłuszczowej. Kanfi i wsp. [111] wskazali również ochronną rolę SIRT6 przed metabolicznymi konsekwencjami otyłości indukowanej dietą. Brak zmian w stężeniach SIRT6 w surowicy obserwowany w badaniu własnym może być związany z niekorzystnymi trendami w zmianach stężeń LEP obserwowanych dwa tygodnie po zakończeniu serii. Warto również zauważyć, że pomimo braku istotności statystycznej, trendy zmian SIRT6 w trakcie obserwacji były odwrotne niż dla LEP.

Niniejsze badanie wykazało różne kierunki zmian SIRT1 w zależności od grupy. Seria 10 zabiegów WBC nie spowodowała istotnych zmian, ale po serii 20 zabiegów WBC nastąpił znaczny wzrost w SG i istotny spadek w CG. Ekspresja SIRT1 jest silnie związana z nasileniem stanu zapalnego w organizmie [112]. Otyłość brzuszna również ma istotny wpływ promujący stan zapalny. Badanie przeprowadzone wśród zdrowych Japończyków wykazało, że osoby z otyłością brzuszną miały wyższe stężenie białka C-reaktywnego i interleukiny-6 oraz niższe stężenie ADP w porównaniu z osobami bez otyłości brzusznej [113].

Wskaźnikiem odzwierciedlającym stopień nagromadzenia tkanki tłuszczowej w okolicy brzusznej jest WHtR. Sugeruje się, że wskaźnik ten jest lepszym predyktorem czynników ryzyka kardiometabolicznego i chorób pokrewnych niż WHR [114–116]. W badaniach

własnych stwierdzono dodatnią korelację między SIRT1 a WHtR, ale tylko w czwartym punkcie pomiarowym. W tym czasie WHtR znacząco zmniejszyło się, a stężenie SIRT1 w SG wzrosło, co może być spowodowane zmniejszeniem stanu zapalnego. Konieczne są jednak dalsze badania, obejmujące również ocenę stężeń cytokin prozapalnych, aby zweryfikować tę hipotezę.

Zgodnie z naszą najlepszą wiedzą, w niniejszym badaniu po raz pierwszy oceniono wpływ WBC na stężenie SIRT4. Sirtuina ta przyczynia się do utrzymania odpowiedniego poziomu lipidów w organizmie poprzez hamowanie biosyntezy kwasów tłuszczowych. Zmniejsza również wydzielanie insuliny z komórek β trzustki poprzez hamowanie działania dehydrogenazy glutaminowej [75]. Pozytywny wpływ WBC na stężenie SIRT4 w surowicy w grupie SG może być zatem związany ze spadkiem stężenia insuliny w tej grupie. Z drugiej jednak strony wzrost stężenia SIRT4 może być, podobnie jak w przypadku SIRT1, związany z poprawą wskaźnika WHtR, ale w tym przypadku mechanizm musiałby być powiązany z poprawą profilu lipidów we krwi. Konieczne są dalsze badania, obejmujące ocenę parametrów lipidowych, aby potwierdzić lub obalić tę hipotezę.

Cukrzyca typu 2 jest przewlekłą chorobą metaboliczną charakteryzującą się występowaniem insulinooporności oraz postępującym zaburzeniem wydzielania insuliny przez komórki β wysp trzustkowych. W początkowych etapach choroby zwiększone zapotrzebowanie na insulinę wynikające ze zmniejszonej wrażliwości tkanek na jej działanie prowadzi do mechanizmu kompensacyjnego w postaci hiperinsulinemii. Wraz z progresją choroby dochodzi do stopniowego upośledzenia funkcji komórek β, co skutkuje względnym, a w zaawansowanych stadiach u części pacjentów także znacznym niedoborem insuliny oraz rozwojem hiperglikemii. W zaawansowanych stadiach cukrzycy typu 2 może dochodzić do znacznego zmniejszenia wydzielania insuliny, wynikającego z postępującej dysfunkcji komórek β wysp trzustkowych, co może prowadzić do rozwoju wtórnego niedoboru insuliny. Cukrzyca typu 2 plasuje się w czołówce najszybciej rozwijających się globalnych zagrożeń zdrowotnych tego stulecia [117]. Podobnie jak otyłość, cukrzyca typu 2 jest przewlekłą i postępującą chorobą, a najsilniejszym czynnikiem ryzyka cukrzycy typu 2 jest nadmiar tkanki tłuszczowej [118].

W niniejszym badaniu wykazano, że po serii 20 zabiegów WBC stężenie FBG znacznie spadło, a HbA1c istotnie spadło 2 tygodnie po zakończeniu interwencji. Było to związane ze spadkiem stężenia insuliny we krwi obserwowanym po 20 zabiegach WBC i poprawą wskaźnika insulinooporności HOMA-IR. Zmiany te wykazano tylko w SG. Obserwowana poprawa wskaźnika HOMA-IR sugeruje wywołaną przez zastosowaną interwencję poprawę wrażliwości na insulinę w SG. Efekty te utrzymywały się także po 2 tygodniach od kasacji interwencji. Początkowo obserwowano wyższe wartości insuliny we krwi w SG, ale różnica ta nie była już później zauważalna ani w trakcie serii zabiegowej ani po 2 tygodniach od kasacji interwencji. W CG wzrost stężenia insuliny odnotowano po 10. zabiegu WBC, z ponownym jej spadkiem po 20. zabiegu WBC. W przypadku fruktozaminy, CG wykazała wzrost wartości po 20. zabiegu WBC. Warto jednak zauważyć, że pomimo niekorzystnego kierunku zmian, wartości tych parametrów pozostały w zakresach referencyjnych, co sugeruje, że metabolizm węglowodanów nie był regulowany negatywnie. U Więcek i wsp. [119] również odnotowano istotny spadek FBG i HbA1c po 30 zabiegach WBC, a także spadek stężenia insuliny i wartości HOMA-IR oraz wzrost QUICKI dwa tygodnie po zakończeniu interwencji u kobiet po menopauzie z cukrzycą typu 2. W grupie kontrolnej, składającej się z kobiet po menopauzie, ale bez cukrzycy typu 2, nie zaobserwowano w cytowanym badaniu istotnych zmian.

Karppinen i wsp. [120] przeprowadzili badania z udziałem 19 otyłych mężczyzn (18-50 lat, BMI <30), których przydzielono do grupy badanej (konwencjonalne leczenie

otyłości i WBC) lub kontrolnej (tylko konwencjonalne leczenie otyłości). Interwencja trwała 12 miesięcy: 5 miesięcy fazy intensywnej i 7 podtrzymującej. U uczestników z obu grup w fazie intensywnej włączona została dieta niskokaloryczna, badani uczęszczali również na sesje grupowe oraz indywidualne, obejmujące terapię behawioralną, jak również poradnictwo w zakresie diety i aktywności fizycznej. Dodatkowo, grupa badana uczestniczyła w 28 sesjach WBC (2 razy tygodniowo). Pomimo iż, WBC nie wpłynęło znacząco na zwiększenie utraty masy ciała, aktywację BAT ani zmianę większości reakcji metabolicznych podczas konwencjonalnego leczenia otyłości, to zaobserwowano większą redukcję stężenia glukozy na czczo u osób poddanych zabiegom kriostymulacji w stosunku do grupy kontrolnej [120].

Podobnie jak u Karppinen i wsp. [120] w badaniu własnym nie wykazano wpływu temperatur kriogenicznych na redukcję masy ciała, jednak odnotowano zmiany dla wskaźnika WHtR. Chociaż w każdym punkcie pomiarowym wykazano wyższe wartości WHtR w SG, analiza poszczególnych grup wykazała, że to właśnie w tej grupie nastąpił istotny spadek wskaźnika po serii zabiegów, który utrzymywał się po 2 tygodniach od kasacji interwencji. Zhang i wsp.[121] wskazali, że WHtR jest wskaźnikiem bardziej powiązanym z cukrzycą niż BMI czy WHR. W niniejszym badaniu wskazano na obecność dodatniej korelacji między WHtR a wskaźnikami metabolizmu węglowodanów: FBG, insuliną i HOMA-IR oraz ujemną korelację z QUICKI i fruktozaminą. Korelacje te sugerują, że poprawa metabolizmu węglowodanów obserwowana u SG może być powiązana z poprawą wskaźnika WHtR.

Wpływ temperatur kriogenicznych na skórę jest wielokierunkowy. Wykazano, że WBC zmniejsza ilość ROS, poprzez zwiększenie całkowitego potencjału antyoksydacyjnego osocza (TAS), a także poprawia krążenie krwi, co zwiększa dopływ tlenu do tkanek i w konsekwencji poprawę wyglądu [1,83,122,123]. Jednak inne mechanizmy dotyczące wpływu na skórę nie są jeszcze w pełni poznane. Przedstawione wyniki wskazują przede wszystkim, że wpływ zabiegów kriogenicznych na skórę zależy od BMI, a osoby z podwyższonymi wartościami tego wskaźnika reagują pozytywnymi zmianami.

W niniejszym projekcie wybrano ocenę cech skóry wyłącznie jednej kończyny: ręki dominującej. Dane literaturowe wskazują, że cechy skóry mogą różnić się między ręką dominującą i niedominującą: a wyższy TEWL odnotowano na ręce dominującej [124], jednocześnie dla tej samej kończyny Enright i Nikolis [125], w obrazowaniu topografii skóry, wykazali wyższe wartości parametrów związanych z głębokością zmarszczek. Wskazuje to, że ręka dominująca, która jest częściej używana do precyzyjnych czynności, może być bardziej podatna na starzenie się skóry. Chociaż inne badania nie potwierdziły występowania różnic pomiędzy ręką dominującą a niedominującą [126,127], w badaniu własnym zdecydowano się wykonać pomiary jedynie na ręce dominującej.

Kolejnym etapem opracowania omawianej części protokołu badania własnego było wskazanie obszarów skóry, które będą objęte obserwacją. Wybrano obszary, które pozostawały niezakryte w czasie trwania zabiegu. Poprzednie badania wykazały, że skóra na różnych obszarach ciała reaguje odmiennie na bodziec kriogeniczny. Zgodnie z wcześniejszymi obserwacjami, również w niniejszym badaniu, skóra na przedramieniu reagowała silniej na bodziec kriogeniczny niż skóra na twarzy [13,93,128]. Różnice te mogą wynikać z obecności na twarzy sebum stanowiącego rodzaj izolacji termicznej, co jednak wymaga dalszego potwierdzenia.

Wartości nawilżenia warstwy rogowej, pH i elastyczności skóry różniły się istotnie w zależności od miejsca pomiaru. Osoby z nadwagą i otyłością charakteryzowały się wyższymi wartościami nawilżenia *stratum corneum* oraz jędrności skóry, a także niższymi wartościami pH na twarzy. U osób o prawidłowej masie ciała odnotowano istotnie wyższe wartości pH

na twarzy. Piotrowska i wsp. [13] oraz Skrzek i wsp. [93] również odnotowały wyższe wartości nawilżenia na twarzy w porównaniu z kończynami. Jednakże, wyniki pH w analizowanych badaniach były niespójne. Piotrowska i wsp. [13] raportowała wyższe pH na skórze twarzy, podczas gdy Skrzek i wsp. [93] nie odnotowali różnic pH na mierzonych obszarach. Kierunki zmian wyników pomiarów pH skóry uzyskanych w niniejszym badaniu są niejednoznaczne, ale warto zauważyć, że we wszystkich wymienionych badaniach wartości pH mieściły się w zakresie wartości fizjologicznych.

Po pierwszym zabiegu na skórze przedramienia w CG zaobserwowano istotną poprawę nawilżenia *stratum corneum*. Poprawę nawilżenia wskazano również we wcześniejszym badaniu [13], ale nie osiągnięto istotności statystycznej. W cytowanym badaniu [13] skóra ochotników znajdowała się w zakresie odpowiadającym skórze suchej, podczas gdy w niniejszym badaniu stwierdzono, że skóra ochotników była odpowiednio nawilżona, co może mieć wpływ na końcowy wynik badania i sugeruje, że w przypadku skóry suchej sam bodziec kriogeniczny nie będzie wystarczający.

Badanie przekrojowe [129] wykazało, że otyłość wpływa na stopień nawodnienia warstwy rogowej naskórka na przedramieniu. Polak-Bielawska i wsp. [94] wskazały na dodatnią korelację pomiędzy masą ciała a poziomem nawodnienia naskórka. W niniejszym badaniu nie stwierdzono różnic w wyjściowych parametrach nawilżenia *stratum corneum* między grupami ani nie stwierdzono związku między BMI a stopniem nawilżenia *stratum corneum*. Po 19. zabiegu skóra osób z SG charakteryzowała się jednak wyższym poziomem nawilżenia warstwy rogowej niż przed serią zabiegów (bez różnic w CG). Otyłość powoduje zmiany strukturalne i funkcjonalne w mikronaczyniach, w tym dysfunkcję śródbłonka. Badania osób otyłych wykazały istotne zmiany w ekspresji genów kodujących białka, które zmieniają natlenienie skóry i mogą przyczyniać się do gorszego gojenia się ran i owrzodzeń [130]. Kontrola napięcia naczyniowego i wydzielanie czynników parakrynnych jest w otyłości upośledzone, co wpływa na czynność narządów i przyczynia się do zaburzenia uwalniania adipokin i cytokin zapalnych [131]. Jak wspomniano wcześniej, krioterapia powoduje nasilenie odruchu mikronaczyniowego. Dysfunkcja mikronaczyniowa u osób otyłych może zatem również wpływać na odpowiedź skóry na kriostymulację. W związku z tym można przypuszczać, że obserwowany wzrost uwodnienia warstwy rogowej naskórka w grupie SG mógł być związany z większą reaktywnością skóry u osób otyłych na bodziec kriogeniczny. Jednym z prawdopodobnych mechanizmów mogą być zmiany w mikrokrążeniu skórnym związane z chorobą otyłościową [130], jednak potwierdzenie takiej zależności wymaga dalszych badań.

Skóra osób w normowadze inaczej reagowała na bodziec kriogeniczny niż skóra osób z grupy badanej. Przed 10. zabiegiem skóra SG na przedramieniu miała niższe wartości nawilżenia i pomiaru TEWL niż na początku badania, podczas gdy w CG nastąpił wzrost tych pomiarów. Kolejno, przed 20. zabiegiem WBC nastąpił wzrost tych pomiarów w SG i spadek w CG. Wartość pH wzrosła po 9. zabiegach w SG, zarówno na przedramieniu jak i twarzy, a następnie spadła. Ponownie, skóra CG zareagowała odwrotnie.

Prawidłowe pH skóry mieści się w zakresie 4,1–4,8, co zapewnia integralność warstwy rogowej poprzez regulowanie jej homeostazy [132]. Kwaśne pH skóry chroni komensalną mikroflorę skóry, która działa jako pierwsza linia obrony przed patogenami [133]. W wyniku szeregu czynników (np. cukrzycy, starzenia się skóry i szeregu dermatoz) może wystąpić dysbioza, zwiększając ryzyko infekcji [132]. Ma i wsp. [134] wskazali na różnice w mikrobiomie skóry i właściwościach biofizycznych skóry u osób o różnym stopniu BMI. Grupa z nadwagą charakteryzowała się większą liczebnością: bakterii *Streptococcus i Corynebacterium oraz grzybów Malassezia i Candida* na skórze twarzy oraz niższymi

wartościami pH. Wskazano także na ujemną korelację pH i z względną liczebnością grzybów *Malassezia, Candida i Cladosporium*. Informacje na temat wpływu BMI na pH skóry są jednak sprzeczne. Ibuki i wsp. [135] wykazali, że pH skóry było nieznacznie wyższe w grupie osób z wyższym BMI. Yew i wsp. [136] nie wykazali różnic w pomiarach pH u osób z prawidłowym i wysokim BMI. Podobnie w niniejszym badaniu - nie wykazano różnic w wyjściowych pomiarach pH między grupami.

W badaniu własnym początkowo pH w SG znacznie wzrosło, osiągając wartości na granicy fizjologicznego pH skóry i w tym punkcie pomiarowym różnica pH była istotna między grupami. W SG nastąpił późniejszy znaczny spadek pH, co dodatkowo potwierdza tezę o konieczności zwiększenia liczby zabiegów ze standardowych 10 u osób o podwyższonej masie ciała. Warto zauważyć, że mimo zmian, wartości pH mieściły się w zakresie wartości fizjologicznych przez cały czas. W innej pracy dotyczącej krioterapii [93] wartości pH również utrzymywały się w stałym, kwaśnym zakresie, ale nie zaobserwowano istotnych różnic w trakcie serii zabiegowej.

Pomiar pH skóry jest możliwy dzięki obecności wody na jej powierzchni. Najwyższe wartości pH odnotowuje się w obszarach najbardziej nawodnionych [137]. Zasadowe pH skóry zwiększa aktywność proteaz, w tym m.in. proteazy serynowej, co skutkuje degradacją korneodesmosomów i prowadzi do niefizjologicznego złuszczania naskórka. W konsekwencji, zaburzenie integralności bariery naskórkowej nasila również TEWL [138]. Zwiększona wartość TEWL, wynikająca z obniżenia funkcji barierowych, wskazywałaby zatem na wyższe wartości pH. Warto zauważyć, że u uczestników badania zaobserwowano odwrotną zależność. Wraz ze wzrostem TEWL wartości pH spadały i odwrotnie. Oba te parametry są kluczowymi wskaźnikami prawidłowego funkcjonowania bariery hydrolipidowej. Możliwe, że skóra, w odpowiedzi na zwiększoną utratę wody, wyzwala reakcje obronne w celu utrzymania integralności bariery naskórkowej, obniżając wartość pH. Na podstawie niniejszych badań można zatem wnioskować, że krioterapia nie wpływa negatywnie na pH skóry, a tym samym można założyć, że nie ma negatywnego wpływu na mikrobiom skóry i barierę hydrolipidową. Potwierdzenie tej hipotezy wymaga jednak dalszych, bardziej szczegółowych badań.

Jedyną niekorzystną zmianą odnotowaną w obu grupach podczas serii zabiegów był wzrost TEWL, który może być spowodowany wzmożonym odruchem naczyniowym w odpowiedzi na zimno. Piotrowska i wsp. [13] również odnotowały wzrost TEWL po pojedynczym zabiegu WBC. SG początkowo charakteryzowała się wyższymi wartościami TEWL niż CG, co jest zgodne z wcześniejszymi obserwacjami [134,139]. Guida i wsp. [140] zaobserwowali istotnie niższe wartości TEWL u osób otyłych w porównaniu z grupą o prawidłowej masie ciała, ale nie wykazano korelacji między TEWL a BMI. W niniejszym badaniu odnotowano taką korelację, podobnie jak w badaniach Polak-Bielawskiej i wsp. [94] oraz Yew i wsp. [27]. Autorzy [27] zauważyli, że wraz ze wzrostem BMI o 1 km/m^2, TEWL wzrastał o 0,221%. Pacjenci otyli mają większe fałdy skórne i grubsze warstwy tłuszczu podskórnego. Aby zapewnić prawidłową termoregulację, ta grupa, w porównaniu z osobami o prawidłowej masie ciała, wydziela więcej potu, a zatem parowanie wody z powierzchni skóry jest wyższe [141].

Wartość R0 wskazuje na amplitudę na końcu fazy zassania [142]. Im niższa wartość R0, tym skóra jest jędrniejsza i bardziej napięta. Wyższe wartości parametru R0 mogą oznaczać większą wiotkość skóry, mniejszą odporność mechaniczną, mniejsze napięcie sprężyste, zmiany związane ze starzeniem, fotostarzeniem lub utratą jakości włókien kolagenowych i elastynowych. Grupa SG charakteryzowała się wyższymi wartościami R0 w pomiarze kutometrycznym, co wskazuje na niższą jędrność skóry niż obserwowana u osób z prawidłowym BMI. Warto zauważyć, że średni wiek obu grup był zbliżony, a zatem wpływ

wieku na ten parametr skóry można w badanej grupie wykluczyć. Wpływ otyłości na tempo starzenia się organizmu, w tym skóry, jest coraz częściej odnotowywany w literaturze [143–145]. Liu i wsp. [143] zwrócili uwagę na silne korelacje między otyłością a starzeniem się skóry twarzy. W badaniu na modelu zwierzęcym zaobserwowano, że zawartość kolagenu w skórze była podobna w grupie myszy otyłych i szczupłych, ale powierzchnia skóry osób otyłych była o 60% większa, co przekłada się na słabszą wytrzymałość mechaniczną tej tkanki [146].

Uzyskane w badaniu własnym wyniki wskazują, że seria zabiegów WBC wpływała na właściwości mechaniczne skóry oceniane kutometrem, szczególnie u osób z podwyższonym BMI (SG), u których obserwowano istotne zmniejszenie wartości R0 zarówno w obrębie skóry twarzy, jak i przedramienia. Zmiany te sugerują poprawę właściwości sprężystych i zwiększenie odporności skóry na odkształcenie u osób z nadwagą i otyłością, co doprowadziło do uzyskania parametrów zbliżonych do wartości obserwowanych u osób z prawidłowym BMI (CG), u których parametry skóry pozostawały względnie stabilne w trakcie badania.

6. Wnioski

Przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej badania pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków:

1. U badanych osób po zastosowaniu krioterapii ogólnoustrojowej odnotowano istotne zmiany wybranych parametrów biofizycznych skóry, obejmujące przede wszystkim nawodnienie warstwy rogowej naskórka, pH oraz właściwości mechaniczne skóry. Zarówno po pojedynczym bodźcu kriogenicznym, jak i po serii zabiegów zmiany były bardziej wyraźne w obrębie skóry przedramienia niż twarzy. Uzyskane wyniki wskazują, że odpowiedź skóry na ekspozycję na zimno zależy od liczby zastosowanych zabiegów, wartości wskaźnika BMI oraz lokalizacji anatomicznej ocenianego obszaru.

   Uzyskane wyniki częściowo potwierdziły hipotezę badawczą. Po pojedynczym zabiegu WBC obserwowano poprawę wybranych parametrów skóry: wzrost nawodnienia i poprawę właściwości wiskoelastycznych u osób z prawidłową masą ciała oraz zmniejszenie transepidermalnej utraty wody (TEWL) u osób z nadwagą i otyłością. Po zakończeniu serii zabiegowej korzystne zmiany obejmujące nawodnienie, pH oraz jędrność skóry stwierdzono wyłącznie u osób z podwyższonym BMI. Efekt był bardziej widoczny po zastosowaniu większej liczby zabiegów oraz w obrębie przedramienia.

2. Wyjściowe parametry biofizyczne skóry – TEWL oraz jędrność skóry oceniana parametrem R0 – różniły się między grupami. Zgodnie z postawioną hipotezą, u osób z nadwagą i otyłością stwierdzono wyższe wartości TEWL w obrębie skóry twarzy, co wskazywało na obniżoną integralność bariery naskórkowej. Kierunek zmian TEWL oraz parametru R0 różnił się pomiędzy grupami, potwierdzając zróżnicowaną odpowiedź skóry na bodziec kriogeniczny. Po wykonaniu 10 zabiegów WBC odnotowano obniżenie transepidermalnej utraty wody u osób z nadwagą i otyłością, podczas gdy w grupie kontrolnej obserwowano wzrost tego parametru. Obniżenie wartości parametru R0 u osób z podwyższonym BMI wskazywało na zmniejszenie podatności skóry na odkształcenie i poprawę jej właściwości mechanicznych, prowadząc do wartości zbliżonych do obserwowanych u osób z prawidłowym BMI.

   Uzyskane wyniki potwierdziły hipotezę badawczą. Wartość wskaźnika BMI istotnie różnicowała wybrane wyjściowe parametry biofizyczne skóry – TEWL oraz R0. Wykazano również, że odpowiedź skóry na krioterapię ogólnoustrojową zależała od wartości BMI oraz była modyfikowana przez liczbę zastosowanych zabiegów.

3. Zastosowanie serii zabiegów krioterapii ogólnoustrojowej wiązało się ze zmianami w profilu wybranych adipokin, obejmującymi przede wszystkim leptynę, asprozynę oraz waspinę. Obniżenie stężenia leptyny obserwowano w obu badanych grupach, a efekt ten utrzymywał się podczas oceny pozabiegowej wyłącznie u osób z prawidłową masą ciała. U osób z nadwagą i otyłością obserwowano stopniowe obniżenie stężenia asprozyny, które osiągnęło istotność statystyczną po zakończeniu serii zabiegowej i utrzymywało się podczas oceny pozabiegowej. Nie wykazano istotnych zmian stężenia adiponektyny. W przypadku waspiny odpowiedź była zależna od liczby zastosowanych zabiegów – po 10 zabiegach WBC odnotowano wzrost jej stężenia u osób z nadwagą i otyłością, natomiast po zakończeniu pełnej serii obserwowano tendencję do obniżenia tego parametru.

Uzyskane wyniki częściowo potwierdziły hipotezę badawczą. Zmiany wybranych adipokin wskazywały na możliwą modulację funkcji endokrynnej tkanki tłuszczowej w odpowiedzi na WBC, jednak zakres i trwałość efektu były zależne od wartości BMI oraz liczby zastosowanych zabiegów.

4. Istotną zależność pomiędzy zmianami stężenia wybranych adipokin a wartością wskaźnika BMI wykazano wyłącznie dla leptyny. Zależność ta była istotna we wszystkich analizowanych punktach czasowych. Obserwowane zmiany profilu adipokin różniły się pomiędzy osobami z prawidłowym BMI oraz podwyższonym BMI, wskazując, że odpowiedź na bodziec kriogeniczny może zależeć zarówno od liczby zastosowanych zabiegów, jak i wyjściowego statusu metabolicznego określonego wartością BMI.

   Hipoteza badawcza została potwierdzona częściowo, ponieważ istotną korelację pomiędzy BMI a zmianami profilu adipokin wykazano jedynie w odniesieniu do leptyny.

5. Zastosowanie serii 20 zabiegów krioterapii ogólnoustrojowej wiązało się ze wzrostem stężenia SIRT1 u osób z podwyższonym wskaźnikiem BMI, a efekt ten utrzymywał się podczas oceny pozabiegowej. W grupie kontrolnej obserwowano obniżenie stężenia SIRT1, a wartości tego parametru podczas oceny długoterminowej różniły się istotnie pomiędzy grupami. W przypadku SIRT4 odnotowano wzrost stężenia podczas oceny pozabiegowej, natomiast dla SIRT6 po zakończeniu serii zabiegowej u osób z podwyższonym BMI. W grupie kontrolnej nie wykazano istotnych zmian stężeń SIRT4 i SIRT6. Uzyskane wyniki wskazują, że odpowiedź sirtuin na bodziec kriogeniczny zależy od liczby zastosowanych zabiegów oraz wartości BMI.

   Hipoteza badawcza została potwierdzona częściowo. Zastosowanie serii zabiegów WBC wiązało się ze zmianami stężeń wybranych sirtuin, jednak efekt ten obserwowano głównie u osób z podwyższonym BMI i wymagał zastosowania większej liczby zabiegów.

6. Seria zabiegów krioterapii ogólnoustrojowej wiązała się ze zmianami wybranych wskaźników metabolizmu węglowodanów, obejmującymi obniżenie stężenia glukozy, insuliny oraz hemoglobiny glikowanej (HbA1c). Spadek stężenia insuliny obserwowany u osób z nadwagą i otyłością podczas serii zabiegowej utrzymywał się również po jej zakończeniu. U osób z podwyższonym BMI odnotowano zmniejszenie wartości wskaźnika HOMA-IR, wskazujące na poprawę insulinowrażliwości. Wyjściowo osoby z podwyższonym BMI charakteryzowały się wyższymi wartościami insuliny i HOMA-IR oraz niższymi wartościami QUICKI w porównaniu z grupą kontrolną, natomiast różnice te nie były obserwowane podczas oceny pozabiegowej. U osób z prawidłową masą ciała obserwowano wzrost stężenia fruktozaminy, który utrzymywał się także po kasacji interwencji.

   Hipoteza badawcza została potwierdzona częściowo. Zastosowanie serii zabiegów WBC wiązało się ze zmianami stężeń wybranych sirtuin, jednak efekt ten obserwowano głównie u osób z podwyższonym BMI i wymagał zastosowania większej liczby zabiegów.

Ograniczenia

Mocną stroną badania jest jego innowacyjność. Pomimo coraz częstszego badania wpływu temperatur kriogenicznych na hormony tkanki tłuszczowej, sirtuiny oraz biofizyczne cechy skóry, nadal brakuje jednoznacznych protokołów stosowania kriostymulacji ogólnoustrojowej w przypadku osób o zwiększonej masie ciała. Przedstawione w niniejszej dysertacji badania stanowią pierwsze lub jedne z pierwszych, nielicznych analiz, gdzie obserwowano wpływ zabiegów WBC stosowanych u osób o podwyższonym i prawidłowym wskaźniku BMI w standardowej (10 zabiegów) i rozszerzonej (20 zabiegów) serii na profil waspiny, asprozyny, SIRT1, SIRT4, SIRT6, fruktozaminy, glukozy, hemoglobiny glikowanej oraz insuliny w osoczu.

Niniejszy projekt posiada także potencjalne ograniczenia. Uczestnicy badania z grupy kontrolnej zostali dobrani pod względem cech charakterystyczny grupy badanej. Ostateczny skład grupy kontrolnej był jednak determinowany zakwalifikowaniem ochotników, którzy spełniali odpowiednie kryteria naboru oraz eliminowaniem i rezygnacją uczestników w czasie trwania projektu, co spowodowało nierównomierny rozkład płci pomiędzy grupami. Należy jednak podkreślić, że priorytetowym czynnikiem zmiennym była wartość BMI, a płeć nie była analizowana jako zmienna niezależna. Ponadto średni wiek w obu grupach był porównywalny, co ograniczyło potencjalny wpływ wieku na wyniki. Należy wskazać również, iż ostateczna liczebność obu grup była niewielka. Ponadto w badaniach nie uwzględniono grupy kontrolnej pasywnej – nie badano w odpowiadających punktach czasowych zmian cech skóry, poziomu adipokin, sirtuin oraz metabolizmu węglowodanów u osób, które nie stosowały WBC.

Przyszłe badania powinny zostać przeprowadzone z udziałem większej liczby i bardziej zróżnicowanej populacji uczestników. Szczególnie istotne wydaje się uwzględnienie płci, rodzaju otyłości oraz dystrybucji tkanki tłuszczowej (trzewna/podskórna). Różnice hormonalne pomiędzy kobietami a mężczyznami mogą wpływać na odpowiedź organizmu na zimno kriogeniczne. Podobnie, osoby o różnym stopniu otłuszczenia organizmu mogą inaczej reagować na bodziec kriogeniczny, co wykazano w niniejszej dysertacji. W konsekwencji, zmienne te mogą modulować kierunek zmian i nasilać obserwowane zmiany, zarówno skórne, jak i endokrynologiczne oraz metaboliczne. Uwzględnienie tych zmiennych pozwoliłoby na uzyskanie pełniejszego obrazu działania bodźca kriogenicznego na organizm oraz mechanizmów adaptacyjnych indukowanych jego oddziaływaniem.

7. Piśmiennictwo

1. Sieron, A.; Cieslar, G.; Stanek, A. *Cryotherapy: Theoretical Bases, Biological Effects, Clinical*; α-Medica Press: Poland, Bielsko-Biała, 2010.
2. Lubkowska, A. Therapeutic Application of Cryotherapy in Chronic Diseases. *Fam. Med.Prim, Care Rev.* **2013**, *15*, 233–239.
3. Fayyad, D.M.; Abdelsalam, N.; Hashem, N. Cryotherapy: A New Paradigm of Treatment in Endodontics. *J. Endod.* **2020**, *46*, 936–942, doi:10.1016/j.joen.2020.03.019.
4. Legrand, F.D.; Dugué, B.; Costello, J.; Bleakley, C.; Miller, E.; Broatch, J.R.; Polidori, G.; Lubkowska, A.; Louis, J.; Lombardi, G.; et al. Evaluating Safety Risks of Whole-Body Cryotherapy/Cryostimulation (WBC): A Scoping Review from an International Consortium. *Eur. J. Med. Res.* **2023**, *28*, 387, doi:10.1186/s40001-023-01385-z.
5. Skrzek, A. Historia Krioterapii Ogólnoustrojowej w Polsce. *Acta Bio-Opt. Inform. Med.* **2009**, *15*, 309–314.
6. Legrand, F.D.; Dugue, B.; Miller, E.; Polidori, G.; Lombardi, G.; Fontana, J.M.; Capodaglio, P.; Whole-Body Cryostimulation Working Group of the International Institute Whole-Body Cryostimulation Clinical Applications. In *Whole-Body Cryostimulation: Clinical Applications*; Capodaglio, P., Ed.; Springer, 2024; 197–207 ISBN 9783031185458.
7. Doets, J.J.R.; Topper, M.; Nugter, A.M. A Systematic Review and Meta-Analysis of the Effect of Whole Body Cryotherapy on Mental Health Problems. *Complement. Ther. Med.* **2021**, *63*, doi:10.1016/j.ctim.2021.102783.
8. Kwiecien, S.Y.; McHugh, M.P. The Cold Truth: The Role of Cryotherapy in the Treatment of Injury and Recovery from Exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* **2021**, *121*, 2125–2142, doi:10.1007/s00421-021-04683-8.
9. Rymaszewska, J.; Ramsey, D. Whole Body Cryotherapy as a Novel Adjuvant Therapy for Depression and Anxiety. *Arch. Psychiatr. Psychother.* **2008**, *2*, 49–57.
10. Hohenauer, E.; Taeymans, J.; Baeyens, J.P.; Clarys, P.; Clijsen, R. The Effect of Post-Exercise Cryotherapy on Recovery Characteristics: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One* **2015**, *10*, doi:10.1371/journal.pone.0139028.
11. Stanek, A.; Cholewka, A.; Gadula, J.; Drzazga, Z.; Sieron, A.; Sieron-Stoltny, K.; Cheng, J.; Wei, C. Clinical Study Can Whole-Body Cryotherapy with Subsequent Kinesiotherapy Procedures in Closed Type Cryogenic Chamber Improve BASDAI, BASFI, and Some Spine Mobility Parameters and Decrease Pain Intensity in Patients with Ankylosing Spondylitis? *Biomed. Res. Int.* **2015**, 2015, doi:10.1155/2015/404259.

12. Schaal, K.; Le Meur, Y.; Louis, J.; Filliard, J.R.; Hellard, P.; Casazza, G.; Hausswirth, C. Whole-Body Cryostimulation Limits Overreaching in Elite Synchronized Swimmers. *Med. Sci. Sports Exerc.* **2015**, *47*, 1416–1425, doi:10.1249/MSS.0000000000000546.

13. Piotrowska, A.; Aszklar, K.; Dzidek, A.; Ptaszek, B.; Czerwińska-Ledwig, O.; Pilch, W. The Impact of a Single Whole Body Cryostimulation Treatment on Selected Skin Properties of Healthy Young Subjects. *Cryobiology* **2021**, *100*, 96–100, doi:10.1016/j.cryobiol.2021.03.003.

14. Rymaszewska, J.; Ramsey, D.; Chładzińska, S.; Kiejna, − Whole-Body Cryotherapy as Adjunct Treatment of Depressive and Anxiety Disorders. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **2008**, *56*, 63–68, doi:10.1007/s00005-008-0006-5.

15. Knechtle, B.; Waśkiewicz, Z.; Sousa, C.V.; Hill, L.; Nikolaidis, P.T. Cold Water Swimming—Benefits and Risks: A Narrative Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* **2020**, *17*, 1–20, doi:10.3390/ijerph17238984.

16. Huttunen, P.; Kokko, L.; Ylijukuri, V. Winter Swimming Improves General Well-Being. *Int. J. Circumpolar. Health.* **2004**, *63*, 140–144, doi:10.3402/ijch.v63i2.17700.

17. Bleakley, C.; Bieuzen, F.; Davison, G.; Costello, J. Whole-Body Cryotherapy: Empirical Evidence and Theoretical Perspectives. *Open Access J. Sports Med.* **2014**, 25, doi:10.2147/oajsm.s41655.

18. Costello, J.T.; Culligan, K.; Selfe, J.; Donnelly, A.E. Muscle, Skin and Core Temperature after -110 C Cold Air and 8 C Water Treatment. *PLoS One* **2012**, *7*, doi:10.1371/journal.pone.0048190.

19. Alexander, H.; Brown, S.; Danby, S.; Flohr, C. Research Techniques Made Simple: Transepidermal Water Loss Measurement as a Research Tool. *Journal of Investigative Dermatology* **2018**, *138*, 2295–2300, doi:10.1016/j.jid.2018.09.001.

20. Castellani, J.W.; Young, A.J. Human Physiological Responses to Cold Exposure: Acute Responses and Acclimatization to Prolonged Exposure. *Auton. Neurosci.* **2016**, *196*, 63–74, doi:10.1016/j.autneu.2016.02.009.

21. Zhang, R.; Li, X.; Balasundaram, G.; Li Baocheng; Qi, Y.; Santosa, A.; Chin Tan, T.; Olivo, M.; Bi, R. Hybrid Photoacoustic Ultrasound Imaging System for Cold-Induced Vasoconstriction and Vasodilation Monitoring. *IEEE Trans Biomed Eng.* **2024**, *2*, 712–716, doi:10.1109/TBME.2023.3301013.

22. Sybilski, A. Skin – the Most Important Organ of Our Body. Let's Take Care of It! *Pediatr. Med. Rodz.* **2012**, *8*, 375–379.

23. Harris-Tryon, T.; Grice, E. Microbiota and Maintenance of Skin Barrier Function. *Science* **2022**, *376*, 940–945, doi:10.1126/science.abo0693.

24. Fontana, J.M.; Bozgeyik, S.; Gobbi, M.; Piterà, P.; Giusti, E.M.; Dugué, B.; Lombardi, G.; Capodaglio, P. Whole-Body Cryostimulation in Obesity. A Scoping Review. *J. Therm. Biol.* **2022**, *106*, doi:10.1016/j.jtherbio.2022.103250.

25. Pilch, W.; Piotrowska, A.; Wyrostek, J.; Czerwińska-Ledwig, O.; Ziemann, E.; Antosiewicz, J.; Zasada, M.; Kulesa-Mrowiecka, M.; Żychowska, M. Different Changes in Adipokines, Lipid Profile, and TNF-Alpha Levels between 10 and 20 Whole Body Cryostimulation Sessions in Individuals with I and II Degrees of Obesity. *Biomedicines* **2022**, *10*, doi:10.3390/biomedicines10020269.

26. Hirt, P.A.; Castillo, D.E.; Yosipovitch, G.; Keri, J.E. Skin Changes in the Obese Patient. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2019**, *81*, 1037–1057, doi:10.1016/j.jaad.2018.12.070.

27. Yew, Y.W.; Mina, T.; Ng, H.K.; Lam, B.C.C.; Riboli, E.; Lee, E.S.; Lee, J.; Ngeow, J.; Elliott, P.; Thng, S.T.G.; et al. Investigating Causal Relationships between Obesity and Skin Barrier Function in a Multi-Ethnic Asian General Population Cohort. *Int. J. Obes.* **2023**, *47*, 963–969, doi:10.1038/s41366-023-01343-z.

28. Guo, Z.; Yang, Y.; Liao, Y.; Shi, Y.; Zhang, L. juan Emerging Roles of Adipose Tissue in the Pathogenesis of Psoriasis and Atopic Dermatitis in Obesity. *JID Innov.* **2022**, *2*, 100064, doi:10.1016/j.xjidi.2021.100064.

29. Https://Www.Who.Int/News-Room/Fact-Sheets/Detail/Obesity-and-Overweight.

30. Piché, M.E.; Tchernof, A.; Després, J.P. Obesity Phenotypes, Diabetes, and Cardiovascular Diseases. *Circ. Res.* **2020**, *126*, 1477–1500, doi:10.1161/CIRCRESAHA.120.316101.

31. Mayoral, L.P.C.; Andrade, G.M.; Mayoral, E.P.C.; Huerta, T.H.; Canseco, S.P.; Rodal Canales, F.J.; Cabrera-Fuentes, H.A.; Cruz, M.M.; Pérez Santiago, A.D.; Alpuche, J.J.; et al. Obesity Subtypes, Related Biomarkers & Heterogeneity. *Indian J. Med. Res.* **2020**, *151*, 11–21, doi:10.4103/ijmr.IJMR_1768_17.

32. Polyzos, S.A.; Kountouras, J.; Mantzoros, C.S. Obesity and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: From Pathophysiology to Therapeutics. *Metabolism* **2019**, *92*, 82–97, doi:10.1016/j.metabol.2018.11.014.

33. Almendros, I.; Martinez-Garcia, M.A.; Farré, R.; Gozal, D. Obesity, Sleep Apnea, and Cancer. *Int. J. Obes.* **2020**, *44*, 1653–1667, doi:10.1038/s41366-020-0549-z.

34. Avgerinos, K.I.; Spyrou, N.; Mantzoros, C.S.; Dalamaga, M. Obesity and Cancer Risk: Emerging Biological Mechanisms and Perspectives. *Metabolism* **2019**, *92*, 121–135, doi:10.1016/j.metabol.2018.11.001.

35. Rutkowski, J.M.; Davis, K.E.; Scherer, P.E. Mechanisms of Obesity and Related Pathologies: The Macro- and Microcirculation of Adipose Tissue. *FEBS J.* **2009**, *276*, 5738–5746, doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07303.x.

36. Crewe, C.; An, Y.A.; Scherer, P.E. The Ominous Triad of Adipose Tissue Dysfunction: Inflammation, Fibrosis, and Impaired Angiogenesis. *J. Clin. Invest.* **2017**, *127*, 74–82, doi:10.1172/JCI88883.

37. Siemińska, L. Tkanka Tłuszczowa. Patofizjologia, Rozmieszczenie, Różnice Płciowe Oraz Znaczenie w Procesach Zapalnych i Nowotworowych. *Pol. J. Endocrinol.* **2007**, *58*, 330–342.

38. Nedergaard, J.; Bengtsson, T.; Cannon, B. Unexpected Evidence for Active Brown Adipose Tissue in Adult Humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2007**, *293*, 444–452, doi:10.1152/ajpendo.00691.2006.-The.

39. Cereijo, R.; Villarroya, J.; Villarroya, F. Non-Sympathetic Control of Brown Adipose Tissue. *Int. J. Obes. Suppl.* **2015**, *5*, S40–S44, doi:10.1038/ijosup.2015.10.

40. Skowrońska, B.; Fichna, M.; Fichna, P. Rola Tkanki Tłuszczowej w Układzie Dokrewnym. *Endokrynol. Otył. Zab. Przem. Mat.* **2005**, *1*, 21–29.

41. Oreste Gualillo, C.; Francisco, V.; Pino, J.; Angel Gonzalez-Gay, M.; Mera, A.; Lago, F.; Gómez, R.; Mobasheri, A.; Gualillo, O. Adipokines and Inflammation: Is It a Question of Weight? *Br. J. Pharmacol.* **2018**, *175*, 1569, doi:10.1111/bph.14181.

42. Aguilar-Valles, A.; Inoue, W.; Rummel, C.; Luheshi, G.N. Obesity, Adipokines and Neuroinflammation. *Neuropharmacology* **2015**, *96*, 124–134, doi:10.1016/J.NEUROPHARM.2014.12.023.

43. Blundell, J.E.; Goodson, S.; Halford, J. Regulation of Appetite: Role of Leptin in Signalling Systems for Drive and Satiety. *Int. J. Obes.* **2001**, *25*, 29–34, doi: 10.1038/sj.ijo.0801693.

44. Lin, Z.; Tian, H.; Lam, K.S.L.; Lin, S.; Hoo, R.C.L.; Konishi, M.; Itoh, N.; Wang, Y.; Bornstein, S.R.; Xu, A.; et al. Adiponectin Mediates the Metabolic Effects of FGF21 on Glucose Homeostasis and Insulin Sensitivity in Mice. *Cell Metab.* **2013**, *17*, 779–789, doi:10.1016/j.cmet.2013.04.005.

45. Ouchi, N.; Parker, J.L.; Lugus, J.J.; Walsh, K. Adipokines in Inflammation and Metabolic Disease. *Nat. Rev. Immunol.* **2011**, *11*, 85–97, doi:10.1038/nri2921.

46. Taylor, E.B. The Complex Role of Adipokines in Obesity, Inflammation, and Autoimmunity. *Clin. Sci. (Lond.).* **2021**, *135(6)*, 731–752, doi: 10.1042/CS20200895.

47. Rogers, N.H.; Obin, M.S.; Greenherg, A.S. *Obesity and Adipokines*; Humana Press, 2007.

48. Zorena, K.; Jachimowicz-Duda, O.; Ślęzak, D.; Robakowska, M.; Mrugacz, M. Adipokines and Obesity. Potential Link to Metabolic Disorders and Chronic Complications. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, doi:10.3390/ijms21103570.

49. Kirichenko, T. V.; Markina, Y. V.; Bogatyreva, A.I.; Tolstik, T. V.; Varaeva, Y.R.; Starodubova, A. V. The Role of Adipokines in Inflammatory Mechanisms of Obesity. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, doi:10.3390/ijms232314982.

50. Perakakis, N.; Farr, O.M.; Mantzoros, C.S. Leptin in Leanness and Obesity: JACC State-of-the-Art Review. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2021**, *77*, 745–760, doi:10.1016/j.jacc.2020.11.069.

51. Prieur, X.; Cormont, M.; Wu, J.; Yuan, M.; Li, W.; Zhu, Y.; Yu, B. Asprosin: A Novel Player in Metabolic Diseases. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* **2020**, *11*, 64, doi:10.3389/fendo.2020.00064.

52. Achari, A.E.; Jain, S.K. Adiponectin, a Therapeutic Target for Obesity, Diabetes, and Endothelial Dysfunction. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1–17, doi:10.3390/ijms18061321.

53. Shabir, K.; Brown, J.E.; Afzal, I.; Gharanei, S.; Weickert, M.O.; Barber, T.M.; Kyrou, I.; Randeva, H.S. Asprosin, a Novel Pleiotropic Adipokine Implicated in Fasting and Obesity-Related Cardio-Metabolic Disease: Comprehensive Review of Preclinical and Clinical Evidence. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2021**, *60*, 120–132, doi:10.1016/j.cytogfr.2021.05.002.

54. Friedman, J.M.; Halaas, J.L. Leptin and the Regulation of Body Weight in Mammals. *Nature* **1998**, *395.* doi: 10.1038/27376.

55. Chung, H.S.; Choi, K.M. Organokines in Disease. *Adv. Clin. Chem.* **2020**, *94*, 261–321, doi:10.1016/bs.acc.2019.07.012. doi: 10.1016/bs.acc.2019.07.012.

56. Ren, Y.; Zhao, H.; Yin, C.; Lan, X.; Wu, L.; Du, X.; Griffiths, H.R.; Gao, D. Adipokines, Hepatokines and Myokines: Focus on Their Role and Molecular Mechanisms in Adipose Tissue Inflammation. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* **2022**, *13*, doi:10.3389/fendo.2022.873699.

57. Lonnqvist, F.; Arner, P.; Nordfors, L.; Schalling, M. Overexpression of the Obese (Ob) Gene in Adipose Tissue of Human Obese Subjects. *Nat. Med.* **1995**, *1*, 950–953, doi: 10.1038/nm0995-950..

58. Karbowska, J.; Kochan, Z. Leptyna Jako Hormon Łączący Otyłość z Dysfunkcją Mięśnia Sercowego. *Postepy. Hig. Med. Dosw.* **2012**, *66*, 267–274, doi: 10.5604/17322693.997817.

59. Romere, C.; Duerrschmid, C.; Bournat, J.; Constable, P.; Jain, M.; Xia, F.; Saha, P.K.; Del Solar, M.; Zhu, B.; York, B.; et al. Asprosin, a Fasting-Induced Glucogenic Protein Hormone. *Cell* **2016**, *165*, 566–579, doi:10.1016/j.cell.2016.02.063.

60. Duerrschmid, C.; He, Y.; Wang, C.; Li, C.; Bournat, J.C.; Romere, C.; Saha, P.K.; Lee, M.E.; Phillips, K.J.; Jain, M.; et al. Asprosin Is a Centrally Acting Orexigenic Hormone. *Nat. Med.* **2017**, *23*, 1444–1453, doi:10.1038/nm.4432.

61. Wiecek, M.; Szymura, J.; Sproull, J.; Szygula, Z. Decreased Blood Asprosin in Hyperglycemic Menopausal Women as a Result of Whole-Body Cryotherapy Regardless of Metabolic Syndrome. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 1428, doi:10.3390/jcm8091428.

62. Ouchi, N.; Walsh, K. Adiponectin as an Anti-Inflammatory Factor. *Clin. Chim. Acta.* **2007**, *380*, 24–30, doi:10.1016/j.cca.2007.01.026.

63. Fang, H.; Judd, R.L. Adiponectin Regulation and Function. *Compr. Physiol.* **2018**, *8*, 1031–1063, doi:10.1002/cphy.c170046.

64. Hotta, K.; Funahashi, T.; Arita, Y.; Takahashi, M.; Matsuda, M.; Okamoto, Y.; Iwahashi, H.; Kuriyama, H.; Ouchi, N.; Maeda, K.; et al. Plasma Concentrations of a Novel, Adipose-Specific Protein, Adiponectin, in Type 2 Diabetic Patients. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2000**, *20*, 1595–1599, doi:10.1161/01.ATV.20.6.1595.

65. Arita, Y.; Kihara, S.; Ouchi, N.; Takahashi, M.; Meada, K. Paradoxical Decrease of an Adipose-Specific Protein, Adiponectin, in Obesity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *257*, 79–83, doi:10.1016/J.BBRC.2012.08.024.

66. Kim, J.-Y.; Van De Wall, E.; Laplante, M.; Azzara, A.; Trujillo, M.E.; Hofmann, S.M.; Schraw, T.; Durand, J.L.; Li, H.; Li, G.; et al. Obesity-Associated Improvements in Metabolic Profile through Expansion of Adipose Tissue. *J. Clin. Invest.* **2007**, *117*, doi:10.1172/JCI31021.

67. Kozłowska, M.; Kortas, J.; Żychowska, M.; Antosiewicz, J.; Żuczek, K.; Perego, S.; Lombardi, G.; Ziemann, E. Beneficial Effects of Whole-Body Cryotherapy on Glucose Homeostasis and Amino Acid Profile Are Associated with a Reduced Myostatin Serum Concentration. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 7097, doi:10.1038/s41598-021-86430-9.

68. Kurowska, P.; Mlyczyńska, E.; Dawid, M.; Jurek, M.; Klimczyk, D.; Dupont, J.; Rak, A. Review: Vaspin (SERPINA12) Expression and Function in Endocrine Cells. *Cells* **2021**, *10*, doi:10.3390/cells10071710.

69. Hida, K.; Wada, J.; Eguchi, J.; Zhang, H.; Baba, M.; Seida, A.; Hashimoto, I.; Okada, T.; Yasuhara, A.; Nakatsuka, A.; et al. Visceral Adipose Tissue-Derived Serine Protease Inhibitor: A Unique Insulin-Sensitizing Adipocytokine in Obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2005**, *102*, 10610–10615, doi: 10.1073/pnas.0504703102.

70. Youn, B.S.; Klöting, N.; Kratzsch, J.; Lee, N.; Park, J.W.; Song, E.S.; Ruschke, K.; Oberbach, A.; Fasshauer, M.; Stumvoll, M.; et al. Serum Vaspin Concentrations in Human Obesity and Type 2 Diabetes. *Diabetes* **2008**, *57*, 372–377, doi:10.2337/db07-1045.

71. Jeong, E.; Youn, B.S.; Kim, D.W.; Kim, E.H.; Park, J.W.; Namkoong, C.; Jeong, J.Y.; Yoon, S.Y.; Park, J.Y.; Lee, K.U.; et al. Circadian Rhythm of Serum Vaspin in Healthy Male Volunteers: Relation to Meals. *J Clin. Endocrinol. Metab.* **2010**, *95*, 1869–1875, doi:10.1210/jc.2009-1088.

72. Chang, H.M.; Lee, H.J.; Park, H.S.; Kang, J.H.; Kim, K.S.; Song, Y.S.; Jang, Y.J. Effects of Weight Reduction on Serum Vaspin Concentrations in Obese Subjects: Modification by Insulin Resistance. *Obesity* **2010**, *18*, 2105–2110, doi:10.1038/oby.2010.60.

73. Haigis, M.C.; Sinclair, D.A. Mammalian Sirtuins: Biological Insights and Disease Relevance. *Annu. Rev. Pathol.* **2010**, *5*, 253–295, doi:10.1146/annurev.pathol.4.110807.092250.

74. Jing, H.; Lin, H. Sirtuins in Epigenetic Regulation. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 2350–2375, doi:10.1021/cr500457h.

75. Frydzińska, Z.; Owczarek, A.; Winiarska, K. Sirtuiny i Ich Rola w Regulacji Metabolizmu. *Postepy Biochem.* **2019**, *65*, 31–40, doi:10.18388/pb.2019_254.

76. Dzidek, A.; Czerwińska-Ledwig, O.; Żychowska, M.; Pilch, W.; Piotrowska, A. The Role of Increased Expression of Sirtuin 6 in the Prevention of Premature Aging Pathomechanisms. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, doi:10.3390/ijms24119655.

77. Masoro, E.J. Role of Sirtuin Proteins in Life Extension by Caloric Restriction. *Mech. Ageing Dev.* **2004**, *125*, 591–594, doi:10.1016/j.mad.2004.08.011.

78. Masoro, E.J. Mini-Review Caloric Restriction and Aging: An Update. *Exp. Gerontol.* **2000**, *35*, 299–305, doi: 10.1016/s0531-5565(00)00084-x.

79. Blander, G.; Guarente, L. The Sir2 Family of Protein Deacetylases. *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, *73*, 417–435, doi:10.1146/annurev.biochem.73.011303.073651.

80. Moschen, A.R.; Wieser, V.; Gerner, R.R.; Bichler, A.; Enrich, B.; Moser, P.; Ebenbichler, C.F.; Kaser, S.; Tilg, H. Adipose Tissue and Liver Expression of SIRT1, 3, and 6 Increase after Extensive Weight Loss in Morbid Obesity. *J. Hepatol.* **2013**, *59*, 1315–1322, doi:10.1016/j.jhep.2013.07.027.

81. Pilch, W.; Wyrostek, J.; Major, P.; Zuziak, R.; Piotrowska, A.; Czerwińska-Ledwig, O.; Grzybkowska, A.; Zasada, M.; Ziemann, E.; Żychowska, M. The Effect of Whole-Body Cryostimulation on Body Composition and Leukocyte Expression of HSPA1A, HSPB1, and CRP in Obese Men. *Cryobiology* **2020**, *94*, 100–106, doi:10.1016/j.cryobiol.2020.04.002.

82. Stanek, A.; Cholewka, A.; Wielkoszyński, T.; Romuk, E.; Sieroń, A. Whole-Body Cryotherapy Decreases the Levels of Inflammatory, Oxidative Stress, and Atherosclerosis Plaque Markers in Male Patients with Active-Phase Ankylosing Spondylitis in the Absence of Classical Cardiovascular Risk Factors. *Mediators Inflamm.* **2018**, *2018*, doi:10.1155/2018/8592532.

83. Wojciak, G.; Szymura, J.; Szygula, Z.; Gradek, J.; Wiecek, M. The Effect of Repeated Whole-Body Cryotherapy on SIRT1 and SIRT3 Concentrations and Oxidative Status in Older and Young Men Performing Different Levels of Physical Activity. *Antioxidants* **2021**, *10*, 1–16, doi:10.3390/antiox10010037.

84. Wharton, S.; Lau, D.C.W.; Vallis, M.; Sharma, A.M.; Biertho, L.; Campbell-Scherer, D.; Adamo, K.; Alberga, A.; Bell, R.; Boulé, N.; et al. Obesity in Adults: A Clinical Practice Guideline. *CMAJ.* **2020**, *192*, E875–E891, doi:10.1503/cmaj.191707.

85. Pilch, W.; Wyrostek, J.; Piotrowska, A.; Czerwińska-Ledwig, O.; Zuziak, R.; Sadowska-Krępa, E.; Maciejczyk, M.; Żychowska, M. Blood Pro-Oxidant/Antioxidant Balance in Young Men with Class II Obesity after 20 Sessions of Whole Body Cryostimulation: A Preliminary Study. *Redox Report* **2021**, *26*, 10–17, doi:10.1080/13510002.2021.1881328.

86. Stanek, A.; Romuk, E.; Wielkoszyński, T.; Bartuś, S.; Cieślar, G.; Cholewka, A. Decreased Lipid Profile and Oxidative Stress in Healthy Subjects Who Underwent Whole-Body Cryotherapy in Closed Cryochamber with Subsequent Kinesiotherapy. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2019**, 7524878, doi:10.1155/2019/7524878.

87. Lubkowska, A.; Banfi, G.; Dołe ogonek gowska, B.; d'Eril, G.V.M.; Łuczak, J.; Barassi, A. Changes in Lipid Profile in Response to Three Different Protocols of Whole-Body Cryostimulation Treatments. *Cryobiology* **2010**, *61*, 22–26, doi:10.1016/J.CRYOBIOL.2010.03.010.

88. Weir, C.; Jan, A. *BMI Classificatioon Percentile And Cut Off Points*; Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023.

89. Capodaglio, P.; Alito, A.; Duguè, B.M.; Bouzigon, R.; Lombardi, G.; Miller, E.D.; Verme, F.; Modaffari, G.; Piterà, P.; Ziemann, E.; et al. Contraindications to Whole-Body Cryostimulation (WBC). A Position Paper from the WBC Working Group of the International Institute of Refrigeration and the Multidisciplinary Expert Panel. *Front. Rehabil. Sci.***2025**, *6*, 1567402, doi:10.3389/FRESC.2025.1567402/FULL.

90. Https://Cdn.Who.Int/Media/Docs/Default-Source/Ncds/Ncd-Surveillance/Steps/Part3-Section5.Pdf?Sfvrsn=a46653c7_2.

91. Matthews, D.R.; Hosker, J.R.; Rudenski, A.S.; Naylor, B.A.; Treacher, D.F.; Turner, R.C. Homeostasis Model Assessment: Insulin Resistance and Fl-Cell Function from Fasting Plasma Glucose and Insulin Concentrations in Man. *Diabetologia* **1985**, *28*, 412–419, doi: 10.1007/BF00280883.

92. Katz, A.; Nambi, S.S.; Mather, K.; Baron, A.D.; Follmann, D.A.; Sullivan, G.; Quon, M.J. Quantitative Insulin Sensitivity Check Index: A Simple, Accurate Method for Assessing Insulin Sensitivity In Humans. J Clin Endocrinol Metab. **2000**, *85*, 2402–2410, doi: 10.1210/jcem.85.7.6661.

93. Skrzek, A.; Ciszek, A.; Nowicka, D.; Dębiec-Bąk, A. Evaluation of Changes in Selected Skin Parameters under the Influence of Extremely Low Temperature. *Cryobiology* **2019**, *86*, 19–24, doi:10.1016/j.cryobiol.2019.01.005.

94. Polak-Bielawska, D.; Rejdych, M.; Czerwińska-Ledwig, O.; Kurkiewicz-Piotrowska, A. The Impact of Winter Swimming on Selected Skin Characteristics. *Acta Balneol.* **2025**, *6*, 447–453, doi:10.36740/abal202506106.

95. Wiecek, M.; Szymura, J.; Sproull, J.; Szygula, Z. Whole-Body Cryotherapy Is an Effective Method of Reducing Abdominal Obesity in Menopausal Women with Metabolic Syndrome. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 1–21, doi:10.3390/jcm9092797.

96. Perdomo, C.M.; Cohen, R. V.; Sumithran, P.; Clément, K.; Frühbeck, G. Contemporary Medical, Device, and Surgical Therapies for Obesity in Adults. *Lancet* **2023**, *401*, 1116–1130, doi:10.1016/S0140-6736(22)02403-5.

97. Van De Winckel, A.; Hohenauer, E.; Carmignano, S.M.; Capodaglio, P.; Alito, A.; Duguè, B.M.; Bouzigon, R.; Lombardi, G.; Dorota Miller, E.; Verme, F.; et al. Contraindications to Whole-Body Cryostimulation (WBC). A Position Paper from the WBC Working Group of the International Institute of Refrigeration and the Multidisciplinary Expert Panel. *Front. Rehabil. Sci.* **2025**, *15*, doi:10.3389/fresc.2025.1567402.

98. Cannon, B.; Nedergaard, J. Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiol. Rev.* **2004**, *84*, 277–359, doi:10.1152/physrev.00015.2003.-The.

99. Van Der Lans, A.A.J.J.; Hoeks, J.; Brans, B.; Vijgen, G.H.E.J.; Visser, M.G.W.; Vosselman, M.J.; Hansen, J.; Jörgensen, J.A.; Wu, J.; Mottaghy, F.M.; et al. Cold Acclimation Recruits Human Brown Fat and Increases Nonshivering Thermogenesis. *J. Clin. Invest.* **2013**, *123*, 3395–3403, doi:10.1172/JCI68993.

100. Weiner, J.; Rohde, K.; Krause, K.; Zieger, K.; Klöting, N.; Kralisch, S.; Kovacs, P.; Stumvoll, M.; Blüher, M.; Böttcher, Y.; et al. Brown Adipose Tissue (BAT) Specific Vaspin Expression Is Increased after Obesogenic Diets and Cold Exposure and Linked to Acute Changes in DNA-Methylation. *Mol. Metab.* **2017**, *6*, 482–493, doi:10.1016/j.molmet.2017.03.004.

101. Radzik-Zając, J.; Wytrychowski, K.; Wiśniewski, A.; Barg, W. The Role of the Novel Adipokines Vaspin and Omentin in Chronic Inflammatory Diseases. *Pediatr. Endocrinol. Diabetes Metab.* **2023**, *29*, 48–52, doi:10.5114/pedm.2022.121371.

102. Tindall, C.A.; Dommel, S.; Riedl, V.; Ulbricht, D.; Hanke, S.; Sträter, N.; Heiker, J.T. Membrane Phospholipids and Polyphosphates as Cofactors and Binding Molecules of SERPINA12 (Vaspin). *Molecules* **2020**, *25*, doi:10.3390/molecules25081992.

103. Körner, A.; Neef, M.; Friebe, D.; Erbs, S.; Kratzsch, J.; Dittrich, K.; Blüher, S.; Kapellen, T.M.; Kovacs, P.; Stumvoll, M.; et al. Vaspin Is Related to Gender, Puberty and Deteriorating Insulin Sensitivity in Children. *Int. J. Obes.* **2011**, *35*, 578–586, doi:10.1038/ijo.2010.196.

104. Choi, S.H.; Kwak, S.H.; Lee, Y.; Moon, M.K.; Lim, S.; Park, Y.J.; Jang, H.C.; Kim, M.S. Plasma Vaspin Concentrations Are Elevated in Metabolic Syndrome in Men and

Are Correlated with Coronary Atherosclerosis in Women. *Clin. Endocrinol.* **2011**, *75*, 628–635, doi:10.1111/j.1365-2265.2011.04095.x.

105. Romere C; Duerrschmid C; Bournat, J.; Constable, P.; Jain, M.; Xia, F.; Saha, P.; Del Solar, M.; Zhu, B.; York, B.; et al. Asprosin, a Fasting-Induced Glucogenic Protein Hormone HHS Public Access. *Cell* **2016**, *165*, 566–579, doi:10.1016/j.cell.2016.02.063.

106. Ziemann, E.; Olek, R.A.; Grzywacz, T.; Antosiewicz, J.; Kujach, S.; Łuszczyk, M.; Smaruj, M.; Śledziewska, E.; Laskowski, R. Whole-Body Cryostimulation as an Effective Method of Reducing Low-Grade Inflammation in Obese Men. *J. Physiol. Sci.* **2013**, *63*, 333–343, doi:10.1007/s12576-013-0269-4.

107. Lubkowska, A.; Dudzińska, W.; Bryczkowska, I.; Dołęgowska, B. Body Composition, Lipid Profile, Adipokine Concentration, and Antioxidant Capacity Changes during Interventions to Treat Overweight with Exercise Programme and Whole-Body Cryostimulation. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2015**, *4*, doi:10.1155/2015/803197.

108. Ptaszek, B.; Podsiadło, S.; Wójcik, A.; Czerwińska-Lewig, O.; Teległów, A. The Influence of Whole-Body cryotherapy or Winter Swimming on the Lipid profile and Selected Adipokines. *BMC Sports Sci. Med. Rehabil.* **2023**, 135, doi:10.1186/s13102-023-00744-x.

109. Tang, Q.; Gao, Y.; Liu, Q.; Yang, X.; Wu, T.; Huang, C.; Huang, Y.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Li, R.; et al. Sirt6 in Pro-Opiomelanocortin Neurons Controls Energy Metabolism by Modulating Leptin Signaling. *Mol. Metab.* **2020**, *37*, doi:10.1016/j.molmet.2020.100994.

110. Kuang, J.; Zhang, Y.; Liu, Q.; Shen, J.; Pu, S.; Cheng, S.; Chen, L.; Li, H.; Wu, T.; Li, R.; et al. Fat-Specific Sirt6 Ablation Sensitizes Mice to High-Fat Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance by Inhibiting Lipolysis. *Diabetes* **2017**, *66*, 1159–1171, doi: 10.2337/db16-1225.

111. Kanfi, Y.; Peshti, V.; Gil, R.; Naiman, S.; Nahum, L.; Levin, E.; Kronfeld-Schor, N.; Cohen, H.Y. SIRT6 Protects against Pathological Damage Caused by Diet-Induced Obesity. *Aging Cell* **2010**, *9*, 162–173, doi:10.1111/j.1474-9726.2009.00544.x.

112. Yang, Y.; Liu, Y.; Wang, Y.; Chao, Y.; Zhang, J.; Jia, Y.; Tie, J.; Hu, D. Regulation of SIRT1 and Its Roles in Inflammation. *Front. Immunol.* **2022**, 11, 831168. doi:10.3389/fimmu.2022.831168.

113. Nishida, M.; Moriyama, T.; Sugita, Y.; Yamauchi-Takihara, K. Cardiovascular Diabetology Abdominal Obesity Exhibits Distinct Effect on Inflammatory and Anti-Inflammatory Proteins in Apparently Healthy Japanese Men. *Cardiovasc. Diabetol.* **2007**, *6*, doi:10.1186/1475-2840-6-27.

114. Feng, Q.; Be Sevi C, J.; Conroy, M.; Omiyale, W.; Woodward, M.; Lacey, B.; Allen, N. Waist-to-Height Ratio and Body Fat Percentage as Risk Factors for Ischemic

Cardiovascular Disease: A Prospective Cohort Study from UK Biobank. *Am. J. Clin. Nutr.* **2024**, *119*, 1386–1396, doi:10.1016/j.ajcnut.2024.03.018.

115. Zhang, S.; Fu, X.; Du, Z.; Guo, X.; Li, Z.; Sun, G.; Zhou, Y.; Yang, H.; Yu, S.; Zheng, L.; et al. Is waist-to-height ratio the best predictiveindicator of cardiovascular disease incidence in hypertensive adults? A cohort study. BMC Cardiobasc. Discord. **2022**, *22*, 214, doi:10.1186/s12872-022-02646-1.

116. Rådholm, K.; Chalmers, J.; Ohkuma, T.; Peters, S.; Poulter, N.; Hamet, P.; Harrap, S.; Woodward, M. Use of the Waist-to-Height Ratio to Predict Cardiovascular Risk in Patients with Diabetes: Results from the ADVANCE-ON Study. *Diabetes Obes. Metab.* **2018**, *20*, 1903–1910, doi:10.1111/dom.13311.

117. Henning, R.J. Type-2 Diabetes Mellitus and Cardiovascular Disease. *Future Cardiol.* **2018**, *14*, 491–509, doi:10.2217/FCA-2018-0045.

118. Ruze, R.; Liu, T.; Zou, X.; Song, J.; Chen, Y.; Xu, R.; Yin, X.; Xu, Q. Obesity and Type 2 Diabetes Mellitus: Connections in Epidemiology, Pathogenesis, and Treatments. *Front. Endocrinol.* **2023**, *14*, 1161521, doi:10.3389/fendo.2023.1161521.

119. Wiecek, M.; Szymura, J.; Kusmierczyk, J.; Lipowska, M.; Szygula, Z. Whole-Body Cryotherapy Improves Asprosin Secretion and Insulin Sensitivity in Postmenopausal Women-Perspectives in the Management of Type 2 Diabetes. *Biomolecules* **2023**, *13*, 1602, doi:10.3390/biom13111602.

120. Karppinen, J.E.; Suojanen, L.; Heinonen, | Sini; Kaye, S.; Van Der Kolk, B.W.; White, J.W.; Orava, J.; Seung, |; Lee, H.T.; Dillon, E.; et al. Obesity Clinical Trials and Investigations Effects of Whole-Body Cryotherapy Combined With Conventional Obesity Management Versus Obesity Management Alone: A Clinical Trial. *Obesity* **2025**, *33*, 2112–2127, doi:10.1002/oby.70019.

121. Zhang, F.L.; Ren, J.X.; Zhang, P.; Jin, H.; Qu, Y.; Yu, Y.; Guo, Z.N.; Yang, Y. Strong Association of Waist Circumference (WC), Body Mass Index (BMI), Waist-to-Height Ratio (WHtR), and Waist-to-Hip Ratio (WHR) with Diabetes: A Population-Based Cross-Sectional Study in Jilin Province, China. *J. Diabetes Res.* **2021**, *2021*, 8812431, doi:10.1155/2021/8812431.

122. Herrera, E.; Sandoval, M.C.; Camargo, D.M.; Salvini, T.F. Motor and Sensory Nerve Conduction Are Affected Differently by Ice Pack, Ice Massage, and Cold Water Immersion. *Phys. Ther.* **2010**, *90*, 581–591, doi:10.2522/ptj.20090131.

123. Miller, E.; Mrowicka, M.; Malinowska, K.; Mrowicki, J.; Saluk-Juszczak, J.; Kędziora, J. Effects of Whole-Body Cryotherapy on a Total Antioxidative Status and Activities of Antioxidative Enzymes in Blood of Depressive Multiple Sclerosis Patients. *World J. of Biol. Psychiatry.* **2011**, *12*, 223–227, doi:10.3109/15622975.2010.518626.

124. Treffel, P.; Panisset, P.; Faivre, B.; Agache, P. Hydration. Transepidermal Water Loss, PH and Skin Surface Parameters: Correlations and Variations between Dominant and

Non-Dominant Forearms. *Br. J. Dermatol.* **1994**, *130*, 32–60, doi:10.1111/j.1365-2133.1994.tb02928.x..

125. Enright, K.M.; Nikolis, A. In Vivo Determination of the Skin Surface Topography and Biophysical Properties of Human Hands: Effects of Sex and Hand Dominance. *Skin Res. Technol.* **2020**, *26*, 277–283, doi:10.1111/srt.12796.

126. Piotrowska, A.; Czerwińska-Ledwig, O.; Kotarba, P. Selected Hand Skin Characteristics of Laboratory Diagnosticians. *Med. Pr.* **2020**, *71*, 725–734, doi:10.13075/mp.5893.01000.

127. Szymoniak-Lipska, M.; Dańczak-Pazdrowska, A.; Lipski, A.; Korecka, K.; Żaba, R.; Polańska, A. Transepidermal Water Loss (TEWL) and Transonychial Water Loss (TOWL) Measurements in Healthy Nail Apparatus. *Skin Res. Technol*. **2024**, *30*, doi:10.1111/srt.13851.

128. Cholewka, A.; Stanek, A.; Sieroń, A.; Drzazga, Z. Thermography Study of Skin Response Due to Whole-Body Cryotherapy. *Skin Res. Technol.* **2012**, *18*, 180–187, doi:10.1111/j.1600-0846.2011.00550.x.

129. de Farias Pires, T.; Azambuja, A.P.; Vançan Russo Horimoto, A.R.; Nakamura, M.S.; de Oliveira Alvim, R.; Krieger, J.E.; Pereira, A.C. A Population-Based Study of the Stratum Corneum Moisture. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* **2016**, *9*, 79–87, doi:10.2147/CCID.S88485.

130. Walker, J.M.; Garcet, S.; Aleman, J.O.; Mason, C.E.; Danko, D.; Zuffa, S.; Swann, J.R.; Krueger, J.; Breslow, J.L.; Holt, P.R. Obesity and Ethnicity Alter Gene Expression in Skin. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, doi:10.1038/s41598-020-70244-2.

131. Sorop, O.; Olver, D.; Van De Wouw, J.; Heinonen, I.; Van Duin, R.W.; Duncker, D.J.; Merkus, D. The Microcirculation: A Key Player in Obesity-Associated Cardiovascular Disease Obesity and Microvascular Dysfunction 2 Obesity and Microvascular Dysfunction 3. *Cardiovasc. Res.* **2017**, *113*, 1035–1045, doi: 10.1093/cvr/cvx093.

132. Smythe, P.; Wilkinson, H.N. The Skin Microbiome: Current Landscape and Future Opportunities. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, doi:10.3390/ijms24043950.

133. Hachem, J.P.; Crumrine, D.; Fluhr, J.; Brown, B.E.; Feingold, K.R.; Elias, P.M. PH Directly Regulates Epidermal Permeability Barrier Homeostasis, and Stratum Corneum Integrity/Cohesion. *J. Inves. Dermatol.* **2003**, *121*, 345–353, doi:10.1046/j.1523-1747.2003.12365.x.

134. Ma, L.; Zhang, H.; Jia, Q.; Bai, T.; Yang, S.; Wang, M.; Li, Y.; Shao, L. Facial Physiological Characteristics and Skin Microbiomes Changes Are Associated with Body Mass Index (BMI). *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* **2024**, *17*, 513–528, doi:10.2147/CCID.S447412.

135. Ibuki, A.; Kuriyama, S.; Toyosaki, Y.; Aiba, M.; Hidaka, M.; Horie, Y.; Fujimoto, C.; Isami, F.; Shibata, E.; Terauchi, Y.; et al. Aging-like Physiological Changes in the Skin

of Japanese Obese Diabetic Patients. *SAGE Open Med.* **2018**, *6*, doi:10.1177/2050312118756662.

136. Yew, Y.; Thing, T.; Chambers, J.; Chian, L. Relationship of Adiposity and Skin Epidermal Barrier Status: Results from an Asian General Population Cohort Study. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2019**, *81AB117*.

137. Du Plessis, J.L.; Stefaniak, A.B.; Wilhelm, K.P. Measurement of Skin Surface PH. *Curr. Probl. Dermatol.* **2018**, *54*, 19–25, doi:10.1159/000489514.

138. Brooks, S.G.; Mahmoud, R.H.; Lin, R.R.; Fluhr, J.W.; Yosipovitch, G. The Skin Acid Mantle: An Update on Skin PH. *J. Invest. Dermatol.* **2025**, *145*, 509–521, doi:10.1016/j.jid.2024.07.009.

139. Yang, B.; Lai, Q.; Chen, A.; Ye, L.; Wang, X.; Lai, Y.; Liu, D.; Man, M.Q. Body Mass Index z Scores Correlate with Epidermal Function in Chinese Children. *Diabetes, Metab. Syndr. and Obes.* **2023**, *16*, 3393–3401, doi:10.2147/DMSO.S435512.

140. Guida, B.; Nino, M.; Perrino, N.R.; Laccetti, R.; Trio, R.; Labella, S.; Balato, N. The Impact of Obesity on Skin Disease and Epidermal Permeability Barrier Status. *J. Euro. Acad. Dermatol. Venereol.* **2010**, *24*, 191–195, doi:10.1111/j.1468-3083.2009.03503.x.

141. Yosipovitch, G.; DeVore, A.; Dawn, A. Obesity and the Skin: Skin Physiology and Skin Manifestations of Obesity. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2007**, *56*, 901–916, doi:10.1016/j.jaad.2006.12.004.

142. Https://Www.Courage-Khazaka.Com/En/Scientific-Products/Cutometer-Dual-Mpa-580.

143. Liu, M.; Feng, J. Association between Adiposity and Facial Aging: Results from a Mendelian Randomization Study. *Eur. J. Med. Res.* **2023**, *28*, doi:10.1186/s40001-023-01236-x.

144. Santos, A.L.; Sinha, S. Obesity and Aging: Molecular Mechanisms and Therapeutic Approaches. *Ageing Res. Rev.* **2021**, *67*, doi:10.1016/j.arr.2021.101268.

145. Kruglikov, I.L.; Scherer, P.E. Skin Aging: Are Adipocytes the next Target? *Aging* **2016**, *8*, 1457–1469, doi: 10.18632/aging.100999.

146. Enser, M.; Avery, N.C. Mechanical and Chemical Properties of the Skin and Its Collagen from Lean and Obese-Hyperglycaemic (Ob/Ob) Mice. *Diabetologia* **1984**, *27*, 44–49, doi: 10.1007/BF00253500.

Aneks

Publikacje wchodzące w skład cyklu dysertacyjnego

Publikacja nr 1 ***The Use of Cryotherapy in Cosmetology and the Influence of Cryogenic Temperatures on Selected Skin Parameters-A Review of the Literature***

cosmetics

MDPI

Review

The Use of Cryotherapy in Cosmetology and the Influence of Cryogenic Temperatures on Selected Skin Parameters—A Review of the Literature

Adrianna Dzidek [1] and Anna Piotrowska [2,*]

[1] Doctoral School of Physical Culture Science, University of Physical Education, 31-571 Krakow, Poland
[2] Institute for Basic Sciences, Faculty of Physiotherapy, University of Physical Education, 31-571 Krakow, Poland
* Correspondence: anna.piotrowska@awf.krakow.pl

Abstract: Cryotherapy is becoming an increasingly popular method used in medicine, physiotherapy, and cosmetology. It is used in the form of whole-body cryotherapy (WBC) and local cryotherapy. It is a tool for achieving analgesic and anti-inflammatory effects. Since the beginning of its use, its influence on the mental state has also been pointed out. The aim of this study was to analyze the available literature on the effect of cryogenic temperatures on the skin and the mechanisms induced by such a stimulus and its influence on well-being. A literature search of keywords or phrases was performed in PubMed®. Various effects of WBC on skin characteristics (hydration, pH, level of transepidermal water loss), mechanisms of anti-inflammatory effects, and effects on adipocytes were shown. Research on the impact of individual skin characteristics is not consistent. Positive effects on the reduction of inflammation and oxidative stress have been noted. Cryotherapy is also successfully used in dermatology to treat lentil spots, actinic keratosis, and ingrown toenails, remove viral warts, or relieve itching in atopic dermatitis. The results of the review also indicate the effectiveness of WBC as an adjunctive treatment for obesity. The number of papers available on the direct effects of WBC on the skin is still limited, despite the fact that it represents the first contact of the human body with cryogenic temperatures. Available data show that cold as a physical stimulus can be a safe and useful tool in cosmetology.

Keywords: whole-body cryotherapy; local cryotherapy; skin hydration; transepidermal water loss; skin pH

check for updates

Citation: Dzidek, A.; Piotrowska, A. The Use of Cryotherapy in Cosmetology and the Influence of Cryogenic Temperatures on Selected Skin Parameters—A Review of the Literature. *Cosmetics* **2022**, *9*, 100. https://doi.org/10.3390/cosmetics9050100

Academic Editor: Enzo Berardesca

Received: 4 September 2022
Accepted: 26 September 2022
Published: 29 September 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Background

Whole-body cryotherapy (WBC) is defined as the stimulus transmission of cryogenic temperatures (below −100 °C) for a short period of time (1–3 min) to the surface of the whole body in order to induce physiological responses to cold. By directly affecting the entire body, cold as a stimulus used in WBC affects the endocrine and nervous systems [1]. The aim of cold therapy is to induce physiological or psychological benefits [2]. The purpose of cryotherapy is not to cool the target tissue, but to bring heat from the warmer tissue to the tissue with a lower temperature [3].

Local cryotherapy occurs through the direct contact of cold with the skin, through evaporation or convection. The action of direct contact is the use of cold, cooling or ice compresses, ice massages, and immersion in cold and icy water. Evaporation is a method of generating cold on the skin by means of a rapidly evaporating liquid spray that uses the heat of vaporization. Convective cryotherapy is the introduction of nitrogen gas (−160 to −180 °C) or cold air (−20 to −30 °C) to the skin surface. Deliberate internal administration of cooled CO_2 (−50 to −70 °C) using a specialized probe causes necrosis of the nerve fibers and thus alleviates pain. This method is used for faceted arthrosis [4].

Another form of cold therapy is outdoor swimming in icy waters (rivers, pools, or lakes). Research suggests that winter water baths bring about a number of benefits to the body: Improving endocrine and hematological functions, alleviating mood disorders, and improving overall well-being [5]. People who regularly use such water baths report improved immunity. Stimulation with cold has also been found to improve the ability to cope with stress [6].

Single exposures, as well as the use of a series of cryotherapeutic treatments, are subject to many scientific studies. WBC therapy has been and is used, first of all, in diseases of the musculoskeletal system (e.g., osteoporosis, post-traumatic and overload changes in joints and soft tissues, fibromyalgia, and inflammatory diseases) and the nervous system (e.g., multiple sclerosis, spastic paresis) [7,8]. The positive impact of the WBC on mental health has been demonstrated: It is used to alleviate depression and anxiety syndromes [9]. WBC is also used in sports medicine. It was shown that extreme cold can improve metabolism, physical strength, and act as a pain reliever and improve recovery after exercise [10,11]. It is known that the interaction between the action of cold and the body occurs mainly through the skin. The impact of cold treatments on the condition and functioning of this tissue is still being understood. The aim of this study was to analyze the available literature on the effect of cryogenic temperatures on the skin and the mechanisms induced by such a stimulus and its influence on well-being.

The term cryotherapy is used to describe the treatment of patients. If, however, the procedure is to stimulate or support bioregeneration, the term cryostimulation is used.

Nowadays, it is recognized that procedures in the cryochamber induce a number of beneficial physiological reactions, such as analgesic [10], anti-edema [12], and anti-inflammatory [13] effects, which are associated with effects on the neuromuscular [14], vascular [15], hormonal [1], and immunological [6] systems. Cryotherapy applied locally is used as a form of treatment, treatment support and rehabilitation, and as a pain-relieving factor in some procedures. Other forms of local application of cryogenic temperatures are cryoablation and cryosurgery.

2. Materials and Methods

The work is a narrative review. The PUBMED database was searched using keywords to indicate the relevant literature items published up until 2021. The terms allowing the search for relevant works were the following keywords and their combinations: Whole body cryotherapy, local cryotherapy, cryostimulation and skin, oxidative stress, inflammation, skin properties, and fatty tissue. The analyzed scientific items were of both research and review natures. The data were evaluated to draw conclusions that would answer the research problem. The article that did not meet the criteria were excluded. The quality assessment was performed by both researchers, independently. A total of 7 articles focused on the analgesic effect (3 studies, 4 reviews), 6 on inflammatory markers (5 studies, 1 review), 12 on oxidative stress (5 studies, 7 reviews), 25 on the impact on the skin (15 studies, 10 reviews), 8 on use in dermatology (3 studies, 5 reviews), and 9 on the influence on body fat (5 studies, 4 reviews).

3. Results

3.1. Analgesic Effect

The analgesic effect of cryogenic temperatures is due to the combined effect of several mechanisms. Cryostimulation affects the nervous system (switching off sensory receptors and their connections with proprioreceptors using cold and slowing down the conductivity in sensory fibers) and the hormonal system (increasing the concentration of beta endorphins) [16]. Pertovaara et al. [17] proved experimentally that spinal administration of noradrenaline (NA) to animals relieves pain, which is associated with the activation of the sympathetic nervous system. Huttunen et al. [18] noted that winter bathing significantly increased the level of NA in the plasma. Thus, adrenergic stimulation and the constriction of blood vessels during and after exposure to cold may have a significant effect on reducing

the perception of pain. Another mechanism is the influence on the release of inflammatory mediators, which is seen in the case of inflammatory pain [11]. On the other hand, data from Algafly et al. [19] suggest that cryotherapy may increase the pain threshold and pain tolerance, which is associated with a significant decrease in nerve conduction velocity. In their studies, the pain threshold and pain tolerance were assessed by a pressure algometer (Pain Diagnostic and Thermography, Great Neck, NY, USA) at two different sites. The first assessment site was iced and the second one was non-iced. The circular probe head of the algometer was lowered gradually at a steady rate until discomfort was reported (pain threshold) and removed at the point of the pain becoming unbearable (pain tolerance). The study showed that with a decrease in skin temperature, an increase in pain threshold and pain tolerance occurred [19].

Systemic and local cryostimulation is used to delay muscle soreness after physical effort, relieve pain in sports injuries, and assist in the treatment of joint pain, lower back pain, tendinitis, or sprains [11,20]. In this type of study, the most common assessment tool is the Visual Analogue Scale (VAS).

Cold therapy is increasingly used in beauty salons. The effect of cold on the nerve terminals and the nerve conduction velocity will produce an anesthetic effect [19]. Therefore, it can be used before, during, or after a painful procedure such as laser therapy. This technique is also used to improve the comfort of permanent makeup: It reduces redness and possible bleeding of the treated areas [21]. Different studies on the effectiveness of this method in offsetting pain sensations have not yet been conducted, and it seems that all kinds of subjective tools will be sufficient for evaluation.

3.2. Influence of Cryotherapy on the Level of Inflammatory Markers

Inflammation is a set of processes aimed at defending the body against an inflammatory initiating agent (e.g., microbial, chemical, or physical). It is characterized by the presence of an increased internal temperature, increased blood flow, redness, pain, and impaired function of the inflamed tissue. If the inflammation continues chronically, even at a low intensity, it will contribute to degradative changes, aging of the body, and the appearance of a number of pathophysiological changes including those affecting the skin.

It has been noted that exposure of the body to extreme cold reduces the intensity of inflammatory processes; fewer pro-inflammatory mediators are released, and more anti-inflammatory cytokines are released [13]. Under the influence of low temperatures, the concentration of the acute-phase protein CRP (c-reactive protein), erythrocyte sedimentation rate (ESR), and the concentration of IgA and IgG immunoglobulins and pro-inflammatory interleukins (IL-2, IL-8) decrease. On the other hand, the concentration of interleukin-10 (IL-10), which has an anti-inflammatory effect, increases. In addition, cryotherapy improves humoral and cellular immunity, stimulating B lymphocytes and NK lymphocytes (natural killers). [22] Inflammation is characterized by increased plasma concentrations of circulating proinflammatory cytokines (IL-6, IL-9, and TNF-α, among others). Ziemann et al. [23] demonstrated that the application of a series of 10 WBC treatments reduces TNF-α concentrations, indicating an anti-inflammatory effect of cryostimulation. Pilch et al. [24] noted that a series of 20 cryostimulation treatments significantly reduced CRP protein values among obese subjects, while no significant changes were noted in subjects with normal body mass. This is interesting because obesity is a recognized pathophysiological factor causing chronic inflammation, which increases the likelihood of developing further disease entities of the metabolic syndrome. This also demonstrates that cryochamber treatments will not decrease the concentrations of selected cytokines per se, but only normalize their concentrations.

The activation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) during inflammation in macrophages or muscle cells is thought to result in the release of large amounts of nitric oxide (NO). It is well known that NO is a major vasodilatory mediator and also inhibits the expression of proinflammatory cytokines [25]. On the other hand, NO may be a trigger for inflammation. Więcek et al. [26] subjected 20 men (mean age of 59) to a series of 24

WBC treatments, at a frequency of every other day. In their study, they demonstrated that a series of WBC treatments would increase the expression of iNOS, regardless of physical activity level. Więcek et al. [26], simultaneously with iNOS, examined the levels of CRP and interleukins, namely IL-6, IL-10, and IL-1β. They noted no changes in inflammatory markers. This shows that the body's responses regarding inflammatory markers after exposure to cryogenic temperatures may be different. For clinical conditions that proceed with an increase in inflammatory markers, WBC allows them to decrease. For organisms with physiological concentrations, the treatments will have no effect.

3.3. Cryotherapy and Oxidative Stress and Skin

The theory of aging regarding the effect of reactive oxygen species (ROS) was proposed in 1956 by Denham Harman. He suggested that free radicals accumulate over time and are one of the major factors that contribute to the aging of the body [27]. This concept was the basis for the development of the free radical theory of mitochondrial aging (MFRTA) [28]. ROS are thought to be formed by electron leakage in the respiratory chain in mitochondria. This causes damage to the cytosolic components and the mitochondria themselves. A further consequence is the aging of the body. This theory assumed that ROS are the only source of mitochondrial damage, and it is impossible to block their formation and thus completely repair mitochondria and other subcellular components [29]. However, recently, this theory in relation to the whole organism has been questioned [30–32]. In spite of that, the free radical theory of aging holds true for the second largest human organ, the skin. There is a clear correlation between exposure to ROS from both extrinsic and intrinsic sources and the pro-aging effect [33]. Oxidative stress during aging reduces the expression of antioxidant enzymes, their concentration, or activity, including SOD (superoxide dismutase), CAT (catalase), and GPx (glutathione peroxidase). In addition, the total oxidative status [TOS] increases, while the antioxidant capacity (TAC) decreases [34].

The influence of WBC on the antioxidant status and activity of antioxidant enzymes was studied in healthy subjects, athletes, and patients with various disorders. Miller et al. [35] noted that a series of 10 WBC treatments resulted in an increase in total antioxidant status (TAS) in patients with multiple sclerosis. Wojciak et al. [34] demonstrated an increase in the GPx activity in erythrocyte and plasma TAC levels after the first WBC treatment in a group of older, physically active men. They also showed an increase in CAT activity after a single treatment in young, non-training individuals. Pilch et al. [36] observed a significant increase in CAT activity after a series of 20 WBC treatments in subjects with obesity. Sutkowy et al. [37], in a study involving young, healthy men, demonstrated an increase in the SOD and the GPx activity after a single WBC treatment. Using a series of treatments (at least 12 WBC treatments) resulted in an increase in SOD activity, and increasing the number of treatments to 24 potentiated this effect [36]. The SOD activity was also shown to increase after a series of 20 WBC treatments [38].

3.4. The Impact of Cryotherapy on Skin

The skin is responsible for many defense, secretory, and sensory functions [39]. It is designed to protect the human body against external harmful factors, at the same time ensuring contact with the external environment and recognizing its stimuli. In addition, the skin is equipped with immune cells and a number of receptors essential for the host's defense and the maintenance of tissue homeostasis [40].

The human body is homeothermic, which ensures its proper functioning. In turn, the external temperature (measured on the skin) is dependent on the environment. The maintenance of relative thermal homeostasis is ensured by adipose tissue and hair, which do not allow excessive heat loss.

Skin temperature can be measured using a digital thermometer. An electrode is applied directly to the skin, so temperature measures reflect skin changes with heat lost rather than the direct effect of cold on the thermometer [19]. Another tool for assessing skin temperature is the Hanna Instruments HI-8751 telethermometer with an HI-765Ped

factory-calibrated (ISO 9000) thermistor surface probe [41]. Cholewka et al. in their studies used thermography and contact thermometry. Thermography was performed with a Thermovision Camera AGEMA Type 470 and a Thermovision Camera A40 (Flir Systems Company, Danderyd, Sweden). The distance between the camera and the body needs to be approximately 1.0–1.5 m, depending on the height and size of the human. Contact thermometry was performed using thermocouples Ni-Cr-Ni-Al stacked to the surface of the body with a hypoallergic plaster [42].

In WBC, the temperature of the skin follows the low ambient temperature [43]. Exposing the skin to extreme cold causes significant fluctuations in the skin temperature, which leads to an increase in the activity of skin thermoreceptors and, consequently, to the stimulation of the thermoregulation center in the hypothalamus [14,44]. It was indicated that changes in skin temperature closely correlate with changes in subcutaneous and intramuscular temperatures [41,44]. However, Jutte et al. [45] showed that the variability of skin temperature is only responsible for 21% of the variability of the temperature in the muscle. In this research, the absolute value of temperatures was shown, therefore it cannot be directly compared with results in other papers. Nevertheless, the results of the studies by Jutte et al. [45] show that the relationship between skin temperature and the temperature of deep tissues is not clear.

The reaction to cold has two stages. In the first stage, sympathetic adrenergic fibers are stimulated, releasing NA. The speed of nerve conduction slows down and local blood vessels narrow [14,46]. In the second stage, there is a rapid expansion of blood vessels and tissue reperfusion. Such stimulation of microcirculation with increased reperfusion after limited blood flow in the narrowed vessels increases the supply of oxygen to cells and other nutrients, which will likely also improve the appearance of the skin. Such an action is to be expected with repeated exposure to low temperatures. It is indicated that the stimulation of microcirculation will support the penetration and distribution of medicinal or cosmetic preparations used immediately after the WBC treatment [1]. As indicated earlier, WBC has an inhibitory effect on the amount of ROS and stimulates the number of antioxidants produced by the body [34,35,37]. Therefore, the use of multiple cryotherapy treatments may bring effects similar to those observed after the use of cosmetics or nutricosmetics that improve the prooxidative-antioxidant balance [1,47].

With age, an accumulation of cellular damage leading to metabolic dysfunction and chronic inflammation is observed [48]. Aging cells are responsible for the appearance of wrinkles and morphological changes in elastin fibers [49]. They are unable to divide but remain metabolically active. They secrete numerous pro-inflammatory cytokines (including IL-6, IL-8), growth factors, chemokines, and proteases, known as the aging-associated secretory phenotype (SASP). It is shown that the number of SASP-expressing fibroblasts increases with age [50,51]. It has been also noted that in keratinocytes of aging skin, the secretion of IL-1α is higher, which may be related to the inflammation process occurring in these cells [52]. It contributes to a malfunction of whole skin tissue. The pro-inflammatory environment of the skin affects the reconstruction and damage of the extracellular matrix (ECM), thus disrupting the wound-healing process. Therefore, especially in the elderly, the inflammation process will affect the appearance and architecture of the skin and also the immune function of the skin [50].

Table 1. Changes in selected skin features due to single or repeated whole-body cryotherapy treatments.

	Subjects	Intervention	Observation
Piotrowska et al. [53]	women (n = 43) and men (n = 33) 23.63 (SD = 1.36)	1	Hydration: no impact TEWL: deterioration pH: no impact
Skrzek et al. [54]	women (n = 20) 5.87 (SD = 7.54)	10	Hydration: improvement after the first 3 treatments, deterioration after the entire series pH: no impact Lubrication: no impact
Kang [55]	women (11) 30–40	12	Hydration: improvement Lubrication: improvement

SD: standard deviation; TEWL: Transepidermal Water Loss.

The number of available studies describing the direct impact of cryotherapy on skin parameters is very limited (Table 1). Piotrowska et al. [53] showed the effect of a single systemic cryotherapy treatment on the improvement of skin hydration. As a result of high temperatures, the sweat glands secreted large amounts of fluids and electrolytes. Shamsuddin et al. [56] proved that the ion reabsorption capacity of the sweat gland is significantly lower at cool ambient temperatures compared to optimal. Therefore, it can be presumed that the eccrine glands, in response to extreme cold, will produce sweat slower, which will reduce water leakage from the extracellular space and, consequently, will improve the hydration of the stratum corneum. Skrzek et al. [54] also noted an improvement in the level of hydration after a one-time WBC treatment, but only in three out of eight measured locations (the chin contour, right cheek, and right lower limb). After applying a series of 10 treatments, Skrzek et al. [54] showed a decrease in the level of skin hydration in all measured locations, except for one (the forehead). This exception of the forehead may be due to a large amount of sebum secreted in this area. A significant difference in the cited works is the age of the participants and the number of treatments. Piotrowska et al. [53] investigated the effect of a one-time WBC procedure on skin features among women and men, whose mean age was 23.63 years. Skrzek et al. [54] studied middle-aged women (a mean age of 58.7) who underwent a single WBC treatment and a series of 10 treatments. With age, decreased vasoconstriction in the skin was observed during exposure to cold. Changes in skin blood flow reactions related to aging may contribute to thermoregulation disorders [57], which may have an impact on the results of the level of hydration in the respondents in the studies presented above. Therefore, the initial improvement in skin hydration demonstrated by Piotrowska et al. [53] could, as in the case of Skrzek et al. [54], be reversed under the influence of a series of treatments. However, this hypothesis would require further research to confirm it.

Kang [55] also noted an improvement in epidermal hydration in his research. After a series of treatments, the level of hydration in the group subjected to cryotherapy was 58% and was 53% in the control group. In his research, Kang [55] also noted the effect of cold treatments on the amount of sebum on the skin: 34% in the study group, while in the control group, the change was 27%. The authors indicated the presence of a clear correlation between the level of hydration and the degree of sebum secretion. In line with this observation, it can be concluded that in the study by Skrzek et al. [54], the level of sebum should decrease with the decrease in the level of hydration. However, the authors of the studies did not notice a decrease in sebum levels as a result of cryotherapy [54]. It

may be related to the age of the probes and the activity of the sebaceous glands depending on the activity of the endocrine system [58].

The pH value of the skin is assessed by the presence of water on the surface of the skin. Changes in the skin microcirculation and the activity of sweat glands generated by cryogenic temperature will modulate the amount of water on the skin surface, which may imply changes in the acid–base reaction. Both Piotrowska et al. [53] and Skrzek et al. [54] suggest lowering the skin pH under the influence of WBC, but their results were not statistically significant. It is worth noting that, in both studies, the pH value was within the limits considered beneficial for the skin (in Piotrowska et al. [53], 4.0–6.00; in Skrzek et al. [54], 5.5–6.08).

3.5. Cryotherapy in Dermatology

Dermatological cryotherapy currently uses temperatures ranging from –70 °C to −196 °C, depending on the area of indication. In dermatology, cryotherapy includes any type of application of freezing techniques to remodel, elevate, or destroy diseased tissue or its components [59].

Local cryotherapy using liquid nitrogen is used in dermatology as a therapeutic method. It is used to treat lip injuries, acne scars, and keloids [60], and is also a technique for exfoliating the epidermis (cryopeeling) in the case of photo-damaged skin. Due to the fact that melanocytes are destroyed already at 7 °C, this procedure is also recommended in the case of melanosis [61].

Cryotherapy is also one of the treatments used to treat lentil spots [21] and actinic keratosis (AK) [62], which is a major precursor to squamous cell carcinoma. Liquid nitrogen is also used to remove viral warts caused by the human papilloma virus (HPV) [63].

Cooling the skin relieves itching in atopic dermatitis (AD). Sanders et al. [64], in their studies on the AD mouse model, noted that heating the skin increases scratching attacks and significantly shortens the onset of scratching. They observed an inverse relationship in the case of skin cooling—the onset of scratching was delayed, and the number of attacks decreased.

Cryotherapy can be also used to treat ingrown toenails. Moreover, Turan et al. [65] confirmed in their retrospective study that it can greatly and consistently improve the dermatological life quality index in suitable ingrown toenails.

3.6. WBC vs. Body Fat

Exposure of the body to extreme cold requires high synchronization of the endocrine and circulatory systems and the activation of a number of metabolic processes in order to ensure the body's homeostasis. The somatic and autonomic nervous system is also stimulated, which results in increased catecholamine secretion and stimulation of β-adrenergic receptors. These processes intensify, among others, ATP synthesis, lipolysis, and glycogenesis and increase the activity of membrane transport in muscles [66].

Fontana et al. [67] reviewed the literature of studies on the effects of WBC on obese patients. The results of the review indicate the effectiveness of WBC as an adjunctive treatment for obesity. The authors point to the potent antioxidant and anti-inflammatory activities of cryostimulation, and the importance of WBC as adjunctive therapy in reducing abdominal obesity and body weight. However, the data shown in the review indicate only the effect of WBC as an adjunct, not as the main agent.

The dynamics of the temperature of the outer surface of the human body depend on the ability of tissues to eliminate the loss of heat transferred from the inside of the body to the skin and the thermal gradient between the external environment and the body. The first factor takes into account many variables, such as the amount of body fat and blood supply to the skin and muscles, which will contribute to the formation of thermal resistance. As the thermal resistance increases, so does the insulating capacity. Tissue cooling depends on sexual dimorphism, which results from the differences in the amount and distribution of adipose tissue and the water content in the body. Consequently, the

isolating capacity of men and women may differ [68], which was confirmed experimentally by Cuttel et al. [69]. These authors, in their studies, noticed that women were characterized by lower temperatures assessed on the skin after a one-time WBC treatment than men. This was also confirmed by Polidori et al. [70]. They noticed that the skin temperature in women after the WBC procedure was lower by 2.6 °C in relation to the skin temperature in men. This indicates that women are more sensitive to the effects of extreme cold. According to the authors, the key element of thermal resistance seems to be fatty tissue, related to the percentage of fat [70]. This is confirmed by studies conducted in people with different body compositions. Wyrostek et al. [71] noted that the factor causing differences in the adaptation to cryogenic temperatures may be the amount of adipose tissue, and therefore, for people with disturbed body composition, the number of cryotherapy treatments should be modified. In addition, in a literature review, Fontana et al. [67] indicated that WBC mimics the effect of exercise-induced WBC, and therefore its efficacy will be related to initial physical capacity and percent body fat.

Cryotherapy as a tool for reducing adipose tissue and maintaining the correct body composition can be considered in two ways: As local treatments in the form of cryolipolysis, using local cooling for non-invasive destruction of adipocytes [72], and systemic, affecting the entire patient's body, including metabolites of adipose tissue (lipokines) [24].

Cryolipolysis is based on the assumption that adipocytes are less resistant to cooling than other water-rich skin cells. Cryolipolysis is a non-invasive method used to reduce the number of localized fat deposits by inducing local inflammation of adipose tissue caused by a low temperature. Proper use of low temperatures causes their apoptosis. In turn, the fat cells are absorbed by macrophages and digested by them [73].

4. Conclusions

Cryotherapy has a strong effect on the human body, including the skin, and this effect depends on the number of treatments. The effect of a single visit to the cryochamber may be the opposite of the effect of 10 or 12 treatments, and such series are most often used in rehabilitation or therapy.

Numerous studies indicate a reduction in the severity of inflammation and oxidative stress, which may indirectly affect the aging process of the skin and improve its appearance. An important effect of the treatment is the improvement of blood circulation. At present, there are only a few studies available on the effects of WBC on basic skin characteristics, and the results are not consistent. Nevertheless, the authors unanimously emphasize the safety of cryotherapy treatments for the skin. Further studies on the effects of cryotherapy on the skin seem necessary, and the basic question is how the amount of body fat will modify the effect of cryogenic temperatures on skin tissue in women and men.

Study Limitations

The main limitation of the present review is the small number of publications addressing the issue under study, which directly examined, in an objective manner, the effects of WBC treatments on the skin. A second important limitation is an inability to double-blind the studies. Another limitation is the different treatment protocols and variable conditions for performing treatments in different centers, which implies different degrees of cryogenic effects on the skin.

Author Contributions: Conceptualization, A.P.; methodology, A.P.; software, A.D.; validation, A.D. and A.P.; formal analysis, A.D.; investigation, A.D. and A.P.; resources, A.D.; data curation, A.D.; writing—original draft preparation, A.D. and A.P.; writing—review and editing, A.D. and A.P.; visualization, A.D.; supervision, A.P.; project administration, A.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

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

References

1. Sieron, A.; Cieslar, G.; Stanek, A. *Cryotherapy: Theoretical Bases, Biological Effects, Clinical Applications*; α-Medica Press: Bielsko-Biała, Poland, 2010.
2. Bouzigon, R.; Grappe, F.; Ravier, G.; Dugue, B. Whole- and Partial-Body Cryostimulation/Cryotherapy: Current Technologies and Practical Applications. *J. Therm. Biol.* **2016**, *61*, 67–81. [CrossRef] [PubMed]
3. Fayyad, D.M.; Abdelsalam, N.; Hashem, N. Cryotherapy: A New Paradigm of Treatment in Endodontics. *J. Endod.* **2020**, *46*, 936–942. [CrossRef] [PubMed]
4. Hermann, J. Kryotherapie. *Z. Rheumatol.* **2009**, *68*, 539–542. [CrossRef] [PubMed]
5. Knechtle, B.; Waśkiewicz, Z.; Sousa, C.V.; Hill, L.; Nikolaidis, P.T. Cold Water Swimming—Benefits and Risks: A Narrative Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2020**, *17*, 8984. [CrossRef] [PubMed]
6. Huttunen, P.; Kokko, L.; Ylijukuri, V. Winter Swimming Improves General Well-Being. *Int. J. Circumpolar. Health* **2004**, *63*, 140–144. [CrossRef]
7. Doets, J.J.R.; Topper, M.; Nugter, A.M. A Systematic Review and Meta-Analysis of the Effect of Whole Body Cryotherapy on Mental Health Problems. *Complement Ther. Med.* **2021**, *63*, 102783. [CrossRef]
8. Kwiecien, S.Y.; McHugh, M.P. The Cold Truth: The Role of Cryotherapy in the Treatment of Injury and Recovery from Exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* **2021**, *121*, 2125–2142. [CrossRef]
9. Rymaszewska, J.; Ramsey, D. Whole Body Cryotherapy as a Novel Adjuvant Therapy for Depression and Anxiety. *Arch. Psychiatry Psychother.* **2008**, *2*, 49–57.
10. Cholewka, A.; Drzazga, Z.; Sieroń, A.; Stanek, A. Thermovision Diagnostics in Chosen Spine Diseases Treated by Whole Body Cryotherapy. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2010**, *102*, 113–119. [CrossRef]
11. Hohenauer, E.; Taeymans, J.; Baeyens, J.P.; Clarys, P.; Clijsen, R. The Effect of Post-Exercise Cryotherapy on Recovery Characteristics: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0139028. [CrossRef]
12. Stanek, A.; Sieroń, A. Współczesna Krioterapia Ogólnoustrojowa w Odnowie Biologicznej Contemporary Whole-Body Cryotherapy in Wellness. *Acad. Med. Siles* **2012**, *66*, 64–70.
13. Lubkowska, A.; Dudzińska, W.; Bryczkowska, I.; Dołęgowska, B. Body Composition, Lipid Profile, Adipokine Concentration, and Antioxidant Capacity Changes during Interventions to Treat Overweight with Exercise Programme and Whole-Body Cryostimulation. *Oxid Med. Cell. Longev.* **2015**, *2015*, 803197. [CrossRef] [PubMed]
14. Herrera, E.; Sandoval, M.C.; Camargo, D.M.; Salvini, T.F. Motor and Sensory Nerve Conduction Are Affected Differently by Ice Pack, Ice Massage, and Cold Water Immersion. *Phys. Ther.* **2010**, *90*, 581–591. [CrossRef]
15. Hohenauer, E.; Deliens, T.; Clarys, P.; Clijsen, R. Perfusion of the Skin's Microcirculation after Cold-Water Immersion (10 °C) and Partial-Body Cryotherapy (−135 °C). *Skin Res. Technol.* **2019**, *25*, 677–682. [CrossRef] [PubMed]
16. Malanga, G.A.; Yan, N.; Stark, J. Mechanisms and Efficacy of Heat and Cold Therapies for Musculoskeletal Injury. *Postgrad. Med.* **2015**, *127*, 57–65. [CrossRef] [PubMed]
17. Pertovaara, A.; Kalmari, J.; Med, B. Comparison of the Visceral Antinociceptive Effects of Spinally Administered MPV-2426 (Fadolmidine) and Clonidine in the Rat. *J. Am. Soc. Anesthesiol.* **2003**, *98*, 189–194. [CrossRef]
18. Huttunen, P.; Lando, N.G.; Meshtsheryakov, V.A.; Lyutov, V.A. Effects of Long-Distance Swimming in Cold Water on Temperature, Blood Pressure and Stress Hormones in Winter Swimmers. *J. Therm. Biol.* **2000**, *25*, 171–174. [CrossRef]
19. Algafly, A.A.; George, K.P. The Effect of Cryotherapy on Nerve Conduction Velocity, Pain Threshold and Pain Tolerance. *Br. J. Sports Med.* **2007**, *41*, 365–369. [CrossRef]
20. Bleakley, C.; McDonough, S.; Gardner, E.; Baxter, G.D.; Hopkins, J.T.; Davison, G.W. Cold-Water Immersion (Cryotherapy) for Preventing and Treating Muscle Soreness after Exercise. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2012**, *2*, CD008262. [CrossRef]
21. Herman, J.; Rost-Roszkowska, M.; Skotnicka-Graca, U. Skin Care during the Menopause Period: Noninvasive Procedures of Beauty Studies. *Postep. Derm. Alergol.* **2013**, *30*, 388–395. [CrossRef]
22. Smolander, J.; Leppäluoto, J.; Westerlund, T.; Oksa, J.; Dugue, B.; Mikkelsson, M.; Ruokonen, A. Effects of Repeated Whole-Body Cold Exposures on Serum Concentrations of Growth Hormone, Thyrotropin, Prolactin and Thyroid Hormones in Healthy Women. *Cryobiology* **2009**, *58*, 275–278. [CrossRef] [PubMed]
23. Ziemann, E.; Olek, R.A.; Grzywacz, T.; Kaczor, J.J.; Antosiewicz, J.; Skrobot, W.; Kujach, S.; Laskowski, R. Whole-Body Cryostimulation as an Effective Way of Reducing Exercise-Induced Inflammation and Blood Cholesterol in Young Men. *Eur. Cytokine Netw.* **2014**, *25*, 14–23. [CrossRef] [PubMed]
24. Pilch, W.; Wyrostek, J.; Major, P.; Zuziak, R.; Piotrowska, A.; Czerwińska-Ledwig, O.; Grzybkowska, A.; Zasada, M.; Ziemann, E.; Żychowska, M. The Effect of Whole-Body Cryostimulation on Body Composition and Leukocyte Expression of HSPA1A, HSPB1, and CRP in Obese Men. *Cryobiology* **2020**, *94*, 100–106. [CrossRef] [PubMed]
25. Stanek, A.; Fazeli, B.; Bartuś, S.; Sutkowska, E. The Role of Endothelium in Physiological and Pathological States: New Data. *Biomed. Res. Int.* **2018**, *2018*, 1098039. [CrossRef] [PubMed]

26. Wiecek, M.; Szygula, Z.; Gradek, J.; Kusmierczyk, J.; Szymura, J. Whole-Body Cryotherapy Increases the Activity of Nitric Oxide Synthase in Older Men. *Biomolecules* **2021**, *11*, 1041. [CrossRef]
27. Harman, D. Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. *Sci. Aging Knowl. Environ.* **1956**, *11*, 298–300. [CrossRef]
28. Harman, D. The Biologic Clock: The Mitochondria? *J. Am. Geriatr. Soc.* **1972**, *20*, 145–147. [CrossRef]
29. Gruber, J.; Schaffer, S.; Halliwell, B. The Mitochondrial Free Radical Theory of Ageing–Where Do We Stand? *Front. Biosci.* **2008**, *13*, 6554–6570. [CrossRef]
30. Lapointe, J.; Hekimi, S. When a Theory of Aging Ages Badly. *Cell. Mol. Life Sci.* **2010**, *67*, 1–8. [CrossRef]
31. Buffenstein, R.; Edrey, Y.H.; Mele, J. The Oxidative Stress Theory of Aging: Embattled or Invincible? Insights from Non-Traditional Model Organisms. *Age* **2008**, *30*, 99–109. [CrossRef]
32. Bonawitz, N.D.; Shadel, G.S. Rethinking the Mitochondrial Theory of Aging: The Role of Mitochondrial Gene Expression in Lifespan Determination. *Cell Cycle* **2007**, *6*, 1574–1578. [CrossRef] [PubMed]
33. Rinnerthaler, M.; Bischof, J.; Streubel, M.K.; Trost, A.; Richter, K. Oxidative Stress in Aging Human Skin. *Biomolecules* **2015**, *5*, 545–589. [CrossRef] [PubMed]
34. Wojciak, G.; Szymura, J.; Szygula, Z.; Gradek, J.; Wiecek, M. The Effect of Repeated Whole-Body Cryotherapy on SIRT1 and SIRT3 Concentrations and Oxidative Status in Older and Young Men Performing Different Levels of Physical Activity. *Antioxidants* **2021**, *10*, 37. [CrossRef] [PubMed]
35. Miller, E.; Mrowicka, M.; Malinowska, K.; Mrowicki, J.; Saluk-Juszczak, J.; Kędziora, J. Effects of Whole-Body Cryotherapy on a Total Antioxidative Status and Activities of Antioxidative Enzymes in Blood of Depressive Multiple Sclerosis Patients. *World J. Biol. Psychiatry* **2011**, *12*, 223–227. [CrossRef] [PubMed]
36. Pilch, W.; Wyrostek, J.; Piotrowska, A.; Czerwińska-Ledwig, O.; Zuziak, R.; Sadowska-Krępa, E.; Maciejczyk, M.; Żychowska, M. Blood Pro-Oxidant/Antioxidant Balance in Young Men with Class II Obesity after 20 Sessions of Whole Body Cryostimulation: A Preliminary Study. *Redox Rep.* **2021**, *26*, 10–17. [CrossRef]
37. Sutkowy, P.; Woźniak, A.; Rajewski, P. Single Whole-Body Cryostimulation Procedure versus Single Dry Sauna Bath: Comparison of Oxidative Impact on Healthy Male Volunteers. *Biomed. Res. Int.* **2015**, *2015*, 406353. [CrossRef]
38. Lubkowska, A.; Dołegowska, B.; Szyguła, Z. Whole-Body Cryostimulation-Potential Beneficial Treatment for Improving Antioxidant Capacity in Healthy Men-Significance of the Number of Sessions. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e46352. [CrossRef]
39. Sybilski, A. Skin–the Most Important Organ of Our Body. Let's Take Care of It! *Pediatr. Med. Rodz.* **2012**, *8*, 375–379.
40. Nguyen, A.V.; Soulika, A.M. The Dynamics of the Skin's Immune System. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1811. [CrossRef]
41. Chesterton, L.S.; Foster, N.E.; Ross, L. Skin Temperature Response to Cryotherapy. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* **2002**, *83*, 543–549. [CrossRef]
42. Cholewka, A.; Stanek, A.; Sieroń, A.; Drzazga, Z. Thermography Study of Skin Response Due to Whole-Body Cryotherapy. *Skin Res. Technol.* **2012**, *18*, 180–187. [CrossRef] [PubMed]
43. Darkenski, R.; Kazandjieva, J.; Tsankov, N. Skin Barier Function: Morpgological Basis and REGULATORY Mechanisms. *J. Clin. Med.* **2011**, *4*, 36–45.
44. Kennet, J.; Hardaker, N.; Hobbs, S.; Selfe, J. Cooling efficiency of 4 common cryotherapeutic agents. *J. Athl. Train.* **2007**, *42*, 343–348. [PubMed]
45. Jutte, L.S.; Merrick, M.A.; Ingersoll, C.D.; Edwards, J.E. The Relationship between Intramuscular Temperature, Skin Temperature, and Adipose Thickness during Cryotherapy and Rewarming. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* **2001**, *82*, 845–850. [CrossRef] [PubMed]
46. Leppäluoto, J.; Westerlund, T.; Huttunen, P.; Oksa, J.; Smolander, J.; Dugué, B.; Mikkelsson, M. Effects of Long-Term Whole-Body Cold Exposures on Plasma Concentrations of ACTH, Beta-Endorphin, Cortisol, Catecholamines and Cytokines in Healthy Females. *Scand. J. Clin. Lab. Investig.* **2008**, *68*, 145–153. [CrossRef]
47. de Lima Cherubim, D.J.; Buzanello Martins, C.V.; Oliveira Fariña, L.; da Silva de Lucca, R.A. Polyphenols as Natural Antioxidants in Cosmetics Applications. *J. Cosmet. Dermatol.* **2020**, *19*, 33–37. [CrossRef]
48. Waaijer, M.E.C.; Parish, W.E.; Strongitharm, B.H.; van Heemst, D.; Slagboom, P.E.; de Craen, A.J.M.; Sedivy, J.M.; Westendorp, R.G.J.; Gunn, D.A.; Maier, A.B. The Number of P16INK4a Positive Cells in Human Skin Reflects Biological Age. *Aging Cell* **2012**, *11*, 722–725. [CrossRef]
49. Waaijer, M.E.C.; Gunn, D.A.; Adams, P.D.; Pawlikowski, J.S.; Griffiths, C.E.M.; van Heemst, D.; Slagboom, P.E.; Westendorp, R.G.J.; Maier, A.B. P16INK4a Positive Cells in Human Skin Are Indicative of Local Elastic Fiber Morphology, Facial Wrinkling, and Perceived Age. *J. Gerontol. -Series A Biol. Sci. Med. Sci.* **2016**, *71*, 1022–1028. [CrossRef]
50. Pilkington, S.M.; Bulfone-Paus, S.; Griffiths, C.E.M.; Watson, R.E.B. Inflammaging and the Skin. *J. Investig. Dermatol.* **2021**, *141*, 1087–1095. [CrossRef]
51. Campisi, J. Aging, Cellular Senescence, and Cancer. *Annu. Rev. Physiol.* **2013**, *75*, 685–705. [CrossRef]
52. Okazaki, M.; Yoshimura, K.; Uchida, G.; Harii, K.; Okazaki, M. Correlation between Age and the Secretions of Melanocyte-Stimulating Cytokines in Cultured Keratinocytes and Fibroblasts. *British J. Dermatol.* **2005**, *2*, 20–23. [CrossRef] [PubMed]
53. Piotrowska, A.; Aszklar, K.; Dzidek, A.; Ptaszek, B.; Czerwińska-Ledwig, O.; Pilch, W. The Impact of a Single Whole Body Cryostimulation Treatment on Selected Skin Properties of Healthy Young Subjects. *Cryobiology* **2021**, *100*, 96–100. [CrossRef] [PubMed]

54. Skrzek, A.; Ciszek, A.; Nowicka, D.; Dębiec-Bąk, A. Evaluation of Changes in Selected Skin Parameters under the Influence of Extremely Low Temperature. *Cryobiology* **2019**, *86*, 19–24. [CrossRef] [PubMed]
55. Kang, J.-H. The Comparison about The Effect of Thermotherapy and Cryotherapy on The Skin. *Kor. J. Aesthet Cosmetol.* **2013**, *11*, 281–288.
56. Shamsuddin, A.K.M.; Kuwahara, T.; Oue, A.; Nomura, C.; Koga, S.; Inoue, Y.; Kondo, N. Effect of Skin Temperature on the Ion Reabsorption Capacity of Sweat Glands during Exercise in Humans. *Eur. J. Appl. Physiol.* **2005**, *94*, 442–447. [CrossRef]
57. Charkoudian, N. Mechanisms and Modifiers of Reflex Induced Cutaneous Vasodilation and Vasoconstriction in Humans. *J. Appl. Physiol.* **1985**, *109*, 1221–1228. [CrossRef]
58. Dąbrowska, A.K.; Spano, F.; Derler, S.; Adlhart, C.; Spencer, N.D.; Rossi, R.M. The Relationship between Skin Function, Barrier Properties, and Body-Dependent Factors. *Skin Res. Technol.* **2018**, *24*, 165–174. [CrossRef]
59. Hundeiker, M.; Sebastian, G.; Bassukas, D.; Ernst, K. Kryotherapie in Der Dermatologie. *J. Dtsch. Dermatol. Ges.* **2003**, *1*, 322–327.
60. Ashique, K.; Kaliyadan, F.; Jayasree, P. Cryotherapy: Tips and Tricks. *J. Cutan Aesthet. Surg.* **2021**, *14*, 244–247. [CrossRef]
61. Farberg, A.S.; Donohue, S.; Farberg, A.M.; Teplitz, R.W.; Rigel, D.S. SKIN in-Depth Reviews Cutaneous Implications of Whole Body Cryotherapy. *SKIN J. Cutan. Med.* **2017**, *1*, 15–17.
62. Pasquali, P.; Segurado-Miravalles, G.; González, S. Sequential Treatment of Actinic Keratosis with Cryotherapy and Ingenol Mebutate: Reflectance Confocal Microscopy Monitoring of Efficacy and Local Skin Reaction. *Int. J. Dermatol.* **2018**, *57*, 1178–1181. [CrossRef] [PubMed]
63. Kwok, C.S.; Gibbs, S.; Bennett, C.; Holland, R.; Abbott, R. Topical Treatments for Cutaneous Warts. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2012**, *2012*(9), CD001781. [CrossRef]
64. Sanders, K.M.; Hashimoto, T.; Sakai, K.; Akiyama, T. Modulation of Itch by Localized Skin Warming and Cooling. *Acta Derm Venereol* **2018**, *98*, 855–861. [CrossRef] [PubMed]
65. Turan, Ç.; Şahin, T.; Ekşioğlu, H.M. How Effective Is Cryotherapy Applied to the Nail Fold in Ingrown Toenails? *Acta Dermatovenerol. Alp. Pannonica Adriat.* **2020**, *29*, 11–19. [CrossRef] [PubMed]
66. Baranow, A.M.T. Cieplnofizyczne Procesy Przeprowadzania Krioterapii. *Acta Bio-Optica et Inform. Med.* **2005**, *11*, 47–50.
67. Fontana, J.M.; Bozgeyik, S.; Gobbi, M.; Piterà, P.; Giusti, E.M.; Dugué, B.; Lombardi, G.; Capodaglio, P. Whole-Body Cryostimulation in Obesity. A Scoping Review. *J. Therm. Biol.* **2022**, *106*, 103250. [CrossRef] [PubMed]
68. Hammond, L.E.; Cuttell, S.; Nunley, P.; Meyler, J. Anthropometric Characteristics and Sex Influence Magnitude of Skin Cooling Following Exposure to Whole Body Cryotherapy. *Biomed. Res. Int.* **2014**, *2014*, 628724. [CrossRef]
69. Cuttell, S.; Hammond, L.; Langdon, D.; Costello, J. Individualising the Exposure of −110 °C Whole Body Cryotherapy: The Effects of Sex and Body Composition. *J. Therm. Biol.* **2017**, *65*, 41–47. [CrossRef]
70. Polidori, G.; Cuttell, S.; Hammond, L.; Langdon, D.; Legrand, F.; Taiar, R.; Boyer, F.C.; Costello, J.T. Should Whole Body Cryotherapy Sessions Be Differentiated between Women and Men? A Preliminary Study on the Role of the Body Thermal Resistance. *Med. Hypotheses* **2018**, *120*, 60–64. [CrossRef]
71. Wyrostek, J.; Piotrowska, A.; Czerwińska-Ledwig, O.; Zuziak, R.; Szyguła, Z.; Cisoń, T.; Żychowska, M.; Pilch, W. Complex Effects of Whole Body Cryostimulation on Hematological Markers in Patients with Obesity. *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0249812. [CrossRef]
72. Kilmer, S.L.; Burns, A.J.; Zelickson, B.D. Safety and Efficacy of Cryolipolysis for Non-Invasive Reduction of Submental Fat. *Lasers Surg. Med.* **2016**, *48*, 3–13. [CrossRef] [PubMed]
73. Krueger, N.; Mai, S.V.; Luebberding, S.; Sadick, N.S. Cryolipolysis for Noninvasive Body Contouring: Clinical Efficacy and Patient Satisfaction. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* **2014**, *7*, 201–205. [PubMed]

Publikacja nr 2 ***The Role of Increased Expression of Sirtuin 6 in the Prevention of Premature Aging Pathomechanisms***

International Journal of *Molecular Sciences*

MDPI

Review

The Role of Increased Expression of Sirtuin 6 in the Prevention of Premature Aging Pathomechanisms

Adrianna Dzidek [1], Olga Czerwińska-Ledwig [2], Małgorzata Żychowska [3], Wanda Pilch [2] and Anna Piotrowska [2,*]

[1] Doctoral School of Physical Culture Science, University of Physical Education, 31-571 Krakow, Poland
[2] Institute for Basic Sciences, Faculty of Physiotherapy, University of Physical Education, 31-571 Krakow, Poland
[3] Faculty of Health Sciences and Physical Culture, Biological Fundation of Physical Culture, Kazimierz Wielki University in Bydgoszcz, 85-064 Bydgoszcz, Poland
* Correspondence: anna.piotrowska@awf.krakow.pl

Abstract: Sirtuins, in mammals, are a group of seven enzymes (SIRT1–SIRT7) involved in the post-translational modification of proteins—they are considered longevity proteins. SIRT6, classified as class IV, is located on the cell nucleus; however, its action is also connected with other regions, e.g., mitochondria and cytoplasm. It affects many molecular pathways involved in aging: telomere maintenance, DNA repair, inflammatory processes or glycolysis. A literature search for keywords or phrases was carried out in PubMed and further searches were carried out on the ClinicalTrials.gov website. The role of SIRT6 in both premature and chronological aging has been pointed out. SIRT6 is involved in the regulation of homeostasis—an increase in the protein's activity has been noted in calorie-restriction diets and with significant weight loss, among others. Expression of this protein is also elevated in people who regularly exercise. SIRT6 has been shown to have different effects on inflammation, depending on the cells involved. The protein is considered a factor in phenotypic attachment and the migratory responses of macrophages, thus accelerating the process of wound healing. Furthermore, exogenous substances will affect the expression level of *SIRT6*: resveratrol, sirtinol, flavonoids, cyanidin, quercetin and others. This study discusses the importance of the role of SIRT6 in aging, metabolic activity, inflammation, the wound healing process and physical activity.

Keywords: sirtuins; SIRT6; gene expression; aging; inflammation; metabolism; aging pathomechanism; physical activity

check for updates

Citation: Dzidek, A.; Czerwińska-Ledwig, O.; Żychowska, M.; Pilch, W.; Piotrowska, A. The Role of Increased Expression of Sirtuin 6 in the Prevention of Premature Aging Pathomechanisms. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 9655. https://doi.org/10.3390/ijms24119655

Academic Editor: Wajid Zaman

Received: 19 April 2023
Revised: 23 May 2023
Accepted: 29 May 2023
Published: 2 June 2023

Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Silent information regulator (Sir) proteins belong to NAD^+-dependent deacetylases, enzymes catalyzing the deacetylation reaction. Sirtuins were first discovered in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by virtue of their role in the establishment of transcriptional silencing of mating-type loci. Further studies have shown that Sir2 is also crucial in the partitioning of carbonylated proteins between mother and daughter cells, as well as for silencing at yeast telomeres and in the rDNA. The conserved enzymes called sirtuins, originally discovered in yeast, are produced by almost all organisms, from non-nucleated prokaryotes, to unicellular archaea and bacteria, to mammals [1,2].

Sirtuins play an important role in maintaining health and affect many pathways that increase the lifespan of organisms [1]. In mammals, they constitute a group of seven proteins (SIRT 1–7) belonging to class III histone deacetylases (HDACs). Sirtuins have a common catalytic domain of NAD^+, consisting of about 260 amino acid residues [2]. Individual sirtuin isoforms differ in sequence and length in the N- and C-terminal domains, which affects their enzymatic activity, cellular localization and substrate specificity [3].

Initially, sirtuins were studied in the context of organism aging and gene silencing, but many other biological functions of proteins belonging to this group have been revealed

in mammalian cells [4]. Studies on yeast aging showed a relationship between the *Silent Information Regulator 2 (Sir2)* gene and the viability of budding yeast [5].

Sirtuin 6 (SIRT6), belonging to class IV, is in the cell nucleus. SIRT6 promotes the repair of double-stranded DNA breaks by forming a complex with DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) [6]. It has a hydrophobic pocket where the myristoylated group is located before being cleaved from the modified protein [7,8]. It has been suggested that this enzyme exhibits higher deacylase activity than deacetylase activity [4].

In a healthy organism or with minor damage, this protein promotes cell proliferation and activation of repair processes, while in the case of serious damage, it supports the apoptosis of damaged cells. It is in this mechanism that SIRT6 prevents the proliferation of damaged cancer cells [9,10]. SIRT6 slows down the course of gluconeogenesis by inhibiting the action of the PGC-1α factor. The activity of PGC-1α depends on the degree of its acetylation. This process is controlled by the acetyltransferase GCN5. SIRT6 causes deacetylation and phosphorylation of GCN5, which increases its acetylase activity. Over-acetylating PGC-1α, the acetyltransferase leads to a decrease in its activity and, consequently, to the inhibition of gluconeogenesis [11,12].

The association of sirtuins with aging is a well-known topic. Imai et al. [13] pointed to several mechanisms, including: effects on metabolism and regulation of circadian clock mechanisms, and emphasized that sirtuin activity decreases with age, which should be associated with a decrease in NAD^+. The most important sirtuin described by the paper's authors was SIRT1. Furthermore, it has been the most extensively studied protein of the mammalian sirtuin family. However, it has been shown that not only a loss of SIRT1 activity enhances DNA damage, but also SIRT6 [14]. Therefore, the authors of this review considered it interesting to examine the significance of SIRT6 in the aging process. The mechanisms of SIRT6 action indicate that this protein should be considered as an important element coordinating processes related to maintaining homeostasis and thereby inhibiting the premature aging of the organism. In this respect, knowledge of the mechanisms of SIRT6 action and factors modifying its expression becomes an interesting issue for a number of specialists. Therefore, the aim of this study was to indicate how this protein acts in a healthy organism, what changes are observed in pathological processes and what internal and external stimuli modify the process of *SIRT6* expression.

2. Structure

SIRT6 is a widely expressed protein [15]. Mahlknecht et al. [15] demonstrated that the human *SIRT6* genomic sequence has one single genomic locus, which spans a region of 8427 bp. The human *SIRT6* gene is located on chromosome 19p13.3 and consists of eight exons ranging in size from 60 bp (exon 4) to 838 bp (exon 8). The mRNA for human SIRT6 encodes a protein of 355 amino acids, with a predicted molecular weight of 39.1 kDa and an isoelectric point of 9.12 [9]. SIRT6 is composed of two main domains—a large domain containing a nucleotide binding and Rossmann fold (responsible for binding NAD^+) and a small domain containing a Zn^{2+} binding loop. Zinc ions play a role in maintaining the integrity of the catalytic domain and stabilizing the enzyme structure [16].

Activation and Reactivation of Gene Expression

The DNA molecule, which is a long strand, is wound around histone proteins that constitute a structural element of chromatin. The modification reaction of histone proteins is histone deacetylation, which involves the detachment of an acetyl group from the N-terminus of the histone. This reaction is carried out by histone deacetylases [17].

SIRT6, as a histone deacetylase, inhibits the transcriptional activity of several transcription factors and deacetylates specific histone lysine residues, such as H3K9 and H3K56, depending on NAD^+ [18].

The N-terminal extension of SIRT6 is important for chromatin association and the internal catalytic activity of the core domain [16]. As a non-histone protein deacetylase, SIRT6 deacetylates forkhead box O1 protein, pyruvate kinase M2, C-terminal binding

protein and GATA-binding protein 3 [18]. The C-terminal extension is essential for proper nuclear localization [16].

Although SIRT6-mediated histone deacetylation generally correlates with chromatin condensation and gene silencing [19,20], there is also evidence that SIRT6 can activate certain genes by mediating histone deacetylation. For example, SIRT6 acts as a transcriptional coactivator of erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) to protect against oxidative stress in human mesenchymal stem cells, and it has been found that SIRT6 is in a protein complex with Nrf2 and RNAP II [21,22]. Nrf2 is one of the master regulators of antioxidant responses—binds to the antioxidant response elements (AREs) and activates antioxidant genes, for example, heme oxygenase 1 (HMOX1), which is known for counteracting reactive oxygen species (ROS). In aging cells, a decrease in Nrf2-ARE activity is observed, which may be caused by oxidative stress-related tissue degeneration [21]. Nrf2 activation occurs during evasion from Keap1-mediated proteasomal degradation in the cytosol [23]. SIRT6 activates Nrf2 by inhibiting Keap1 transcription and directly interacting with Nrf2 [24]. It is indicated that SIRT6 is required for HOMX1 induction in response to oxidative stress and SIRT6 deficiency increases basal cellular ROS [21] (Figure 1).

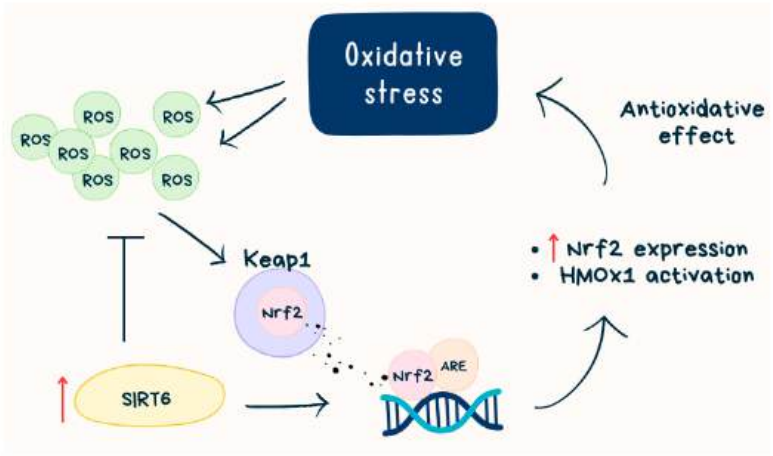


Figure 1. SIRT6 and Nrf2 path. ROS—reactive oxygen species; SIRT6—sirtuin 6, Keap1—Kelch-like ECH-associated protein 1, Nrf2—erythroid 2-related factor 2; ARE—antioxidant response elements; HMOX1—heme oxygenase 1.

3. Aging

Aging of the body is a physiological, dynamic and inevitable process. It is believed that the aging process begins at different times in different systems (the skin is one of the first organs to age). However, aging usually begins in the fourth decade of life and ends at the end of biological life. Important factors influencing aging are extrinsic, biological and psychosocial factors. However, the basic determinant of organism aging is the individual's genotype [25]. Lopez-Otin et al. [26] proposed nine so-called hallmarks of aging: telomere attrition, genomic instability, loss of proteostasis, epigenetic alterations, deregulated nutrient sensing, mitochondrial dysfunction, stem cell exhaustion, cellular senescence and altered intercellular communication. There are some symptoms that occur in psychological aging, but at a younger age [27]. It is associated with accelerated or premature aging, where interrelated molecular and cellular phenomena are intensified.

Nowadays, it is hypothesized that SIRT6 regulates lifespan by influencing a series of processes that control aging, such as genome stability, transcriptional processes of

DNA repair elements, the ability to regulate telomere length and metabolic homeostasis (including carbohydrate metabolism) [9,28,29] (Figure 2).

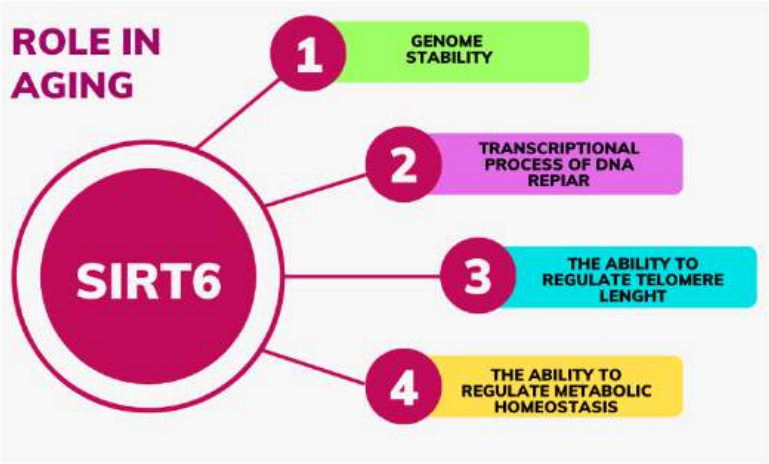


Figure 2. The role of the SIRT6 in aging.

Mostoslavsky et al. [30] demonstrated that mice deficient in SIRT6 are small and develop dysfunctions related to the loss of subcutaneous fat, lordokyphosis and severe metabolic defects by 2–3 weeks of age. These symptoms can be considered similar to those associated with premature aging. These mice eventually died after about 4 weeks. On the other hand, Kanfi et al. [8] observed an extended lifespan of transgenic mice with overexpression of SIRT6 compared to wild-type mice. Interestingly, a significant difference was only observed in males. The authors suggested that this may be related to lower levels of insulin-like growth factor 1 (IGF1) in serum, altered levels of phosphorylation of major IGF1 signaling components and higher levels of IGF1 binding protein, which affects lifespan regulation [31].

Betry et al. [32] conducted a study on 14 men and 12 women in their sixth and seventh decades of life with similar anthropometric and metabolic parameters. The participants underwent six tests: mini-mental state examination—a test that allows for the detection of cognitive dysfunction; Doubis' five-word test—a screening memory task specifically built to discriminate hippocampal memory deficits; Chair Stand Test—allowing for the detection of fall risk in senior patients; Time Up&Go, walking speed and balance tests—allowing for the quantifiable assessment of motor function and serving as an important observation of functional capacity, Center for Epidemiologic Studies Depression scale—CES-D; and Cognitive Difficulties Scale—CDS. Based on the results obtained in the above tests, patients were assigned to the frail group (first tercile of the index score) or the robust group (individuals from the third tercile). The researchers [32] indicated that skeletal muscle biopsies taken from individuals in the robust group showed significantly lower expression of *SIRT6*. However, no differences were observed in the level of expression of this protein in leukocytes isolated from the patients' blood. In the Betry et al. [32] study, an interesting correlation was also noted. The levels of *CPT1b* mRNA are strongly correlated with SIRT6 levels in skeletal muscle. The authors suggested that the overexpression of *CPT1b* in the robust group may at least partially explain their better metabolic profile, and the significant inverse correlation with the level of *SIRT6* expression in muscle could be associated.

SIRT6 is a central regulator of mitochondrial activity in the brain. Deficiency of this protein in the central nervous system leads to mitochondrial deficiency with marked changes

in metabolite content and global downregulation of mitochondria-related genes [33]. The metabolomic changes observed in SIRT6 deficiency lead to an increase in ROS generation. Smirnov et al. [33] indicated that the deficit of SIRT6 in the brain occurs during the aging process of the human brain, especially in patients with Parkinson's, Alzheimer's, Huntington's and Amyotrophic lateral sclerosis disease.

Telomeres shorten with increased turnover and chronological age in somatic stem cells. In early adult life, telomeres help to stabilize the nuclear genome, whereas, in post-reproductive age, they decrease the intensity of age-related changes [34]. Michishita et al. [35] indicated that SIRT6 is associated with specific telomeres, and cells with reduced SIRT6 activity show telomere structures resembling defects observed in Werner syndrome. The Werner syndrome protein (WRN) plays an important role in telomere metabolism and during DNA replication. The connection between WRN and chromatin is closely related to SIRT6-dependent deacetylation of telomeric residues H3K9 and H3K59. Genomic instability with loss of SIRT6 may thus be related to loss of WRN-chromatin connection and influence the redirection of the cell towards premature aging [36]. The cited researchers [35] concluded that SIRT6 contributes to maintaining the specialized chromatin state in mammalian telomeres, which in turn is required for proper telomere metabolism and function. Michishita et al.'s study links SIRT6's chromatin regulation with telomere maintenance and premature aging syndrome [35].

Another mechanism in which *SIRT6* expression will interfere with the aging process is its influence on retrotransposon activity. Transposable elements are DNA sequences capable of integration into other genomic locations [12]. Class I retrotransposons transport via intermediate RNA. Balestrieri et al. [37] identified L1 retrotransposons as a class of transcriptional elements that strongly mediate genomic instability and play a role in age-related pathologies. SIRT6 is a strong repressor of L1 activity, binding to the 5′ UTR of L1 loci. In response to DNA damage and aging, SIRT6 has a reduced ability to bind to L1 loci, contributing to the activation of previously silenced retroelements [38].

Skin aging is the first and most visible sign of aging in the body. Technical advancements in recent years have allowed for a broader examination of the aging process in various types of skin cells. Fibroblasts, as the most numerous types of cells in the dermis, are directly or indirectly responsible for most skin aging characteristics [39]. Sharma et al. [6] demonstrated significantly decreased *SIRT6* expression in fibroblasts of older individuals (above 50 years old) compared to younger individuals (below 18 years old). Furthermore, it was shown that fibroblasts of older individuals were more resistant to reprogramming into induced pluripotent stem cells (iPSCs) compared to fibroblasts of younger individuals. The inclusion of SIRT6 with classical Yamanaka factors in older fibroblasts improved their reprogramming efficiency, which was then similar to that of younger individuals [6].

MicroRNAs (miRNAs) are a class of non-coding RNAs that play a significant role in gene regulation; modulating numerous biological processes; including aging. The influence of miRNAs on the post-transcriptional regulation of SIRT6 is still being studied. Sharma et al. [6] confirmed that SIRT6 regulates the transcription of miR-766, and blocking miR-766 significantly improves the efficiency of reprogramming aging cells. Higher levels of miR-766 in older fibroblasts were inversely correlated with SIRT6 levels [6]. Increasing SIRT6 activity in fibroblasts may therefore slow down skin aging.

An important factor accelerating the aging of the organism is an unhealthy diet and low levels of physical activity and their far-reaching consequences in the form of metabolic syndrome. SIRT6 is indicated as a potential therapeutic target against metabolic syndrome. This protein is associated with calorie reduction. Activating SIRT6 is also suggested to have potentially beneficial effects on age-related metabolic diseases. The development of small molecule *SIRT6* activators could therefore have great therapeutic potential [40].

4. Metabolic Activity

SIRT6 is involved in regulating glucose homeostasis in the body. It has been shown that SIRT6 levels are increased during fasting. Additionally, by increasing the expression of genes involved in gluconeogenesis, it controls this process in the liver. Zhong et al. [41] discovered that the expression of gluconeogenic genes was increased in livers with SIRT6 deficiency. Researchers also identified the role of SIRT6 as a corepressor of Hif1α (Hypoxia-inducible factor 1α), a critical regulator of the response to nutritional stress. Cells deficient in SIRT6 exhibit increased Hif1α activity, thus showing increased glucose uptake. SIRT6, therefore, acts as a corepressor of the transcription factor Hif1α, reducing glycolysis during normal nutrition and stimulating mitochondrial fatty acid oxidation [41].

Kim et al. [42] pointed out that liver-specific deletion of *SIRT6* in mice leads to profound changes in gene expression, causing increased glycolysis, intensified triglyceride synthesis, decreased β-oxidation and liver steatosis. Other authors suggest that SIRT6 may therefore be a potential target in the treatment of liver diseases characterized by lipid accumulation [43].

Dominy et al. [11] indicated the usefulness of activating liver *SIRT6* in the therapeutic treatment of insulin-resistant diabetes. Xiong et al. [44] demonstrated a significant decrease (50%) in glucose-stimulated insulin secretion in mice subjected to *SIRT6* knockdown in pancreatic beta cells. The mice also had lower levels of ATP in the studied cells compared to the wild-type control group. An increased number of damaged mitochondria was also identified. Based on the obtained results, the authors suggested that SIRT6 regulates proper insulin secretion through the regulation of mitochondrial glucose oxidation. Therefore, activating the protein may be helpful in improving insulin secretion in diabetic states. The process described here takes place in the mitochondria. This underscores that SIRT6 acts in many cellular organelles, so it can be said that it acts throughout the cell.

Further experiments have indicated that mice with *SIRT6* knockout were more susceptible to high-fat diet-induced obesity, attributed to adipocyte hypertrophy. Moreover, increased macrophage infiltration into the examined adipose tissue was observed, indicating an intensified inflammatory process in these mice. It was found that SIRT6 regulates energy homeostasis by modulating the activity and expression of lipase in adipose tissue [45]. Kanfi et al. [40] noticed increased glucose tolerance and insulin secretion stimulated by glucose in mice with *SIRT6* overexpression. Their study indicated that *SIRT6* overexpression increases triglyceride clearance in the blood and reduces triglyceride production in adipose tissue. Mice with *SIRT6* overexpression subjected to a high-fat diet accumulated significantly less visceral fat, LDL cholesterol and triglycerides compared to wild-type mice. This suggests a protective role of SIRT6 against metabolic consequences of obesity caused by an improper diet [40]. Tang et al. [46] came to similar conclusions—*SIRT6* overexpression in the arcuate nucleus of the hypothalamus in mice reduced their body weight induced by a high-fat diet. A decrease in the weight of eWAT (epididymal white adipose tissue) and iWAT (inguinal white adipose tissue) and adipocyte size was also observed. Furthermore, the impairment of leptin activity in the POMC neurons of mice subjected to *SIRT6* neuron-specific knockout was demonstrated. These mice exhibited a predisposition to obesity and increased food consumption.

Increased SIRT6 levels were observed in in vivo models—in mice after fasting, rats after caloric restriction and in vitro—in cell cultures in a medium deprived of nutrients. The authors indicated that the increase in SIRT6 levels is caused by the stabilization of the SIRT6 protein, not an increase in *SIRT6* transcription. Moreover, p53 positively regulates SIRT6 protein levels under standard growth conditions but does not play a role in regulating *SIRT6* under caloric restriction [47]. It is widely known that calorie restriction diets (CR) slow down aging processes and may contribute to extending life [48]. In light of the above research, it can be suggested that the beneficial effects of a calorie-restricted diet are strongly related to increased SIRT6 stability, and the increased expression of the protein generated by factors other than starvation may exhibit similar effects to CR [47]. The role of SIRT6 in metabolism has been summarized in Table 1.

Table 1. Role of the SIRT6 in metabolic activity regulation.

	SIRT6 and Metabolic Activity
Obesity	SIRT6 plays a protective role against the metabolic consequences of diet-induced obesity, which suggests a potentially beneficial effect of SIRT6 activation on age-related metabolic diseases [40]. In obese patients, the expression of SIRT6 is reduced. It suggests that SIRT6 is an attractive therapeutic target for treating obesity and obesity-related metabolic disorders [45].
Fat metabolism	SIRT6 plays a critical role in fat metabolism, and may therefore be a potential target in the treatment of liver diseases characterized by lipid accumulation [42].
Carbohydrate metabolism	Activation of hepatic by SIRT6 may be therapeutically useful for treating insulin-resistant diabetes [11]. SIRT6 may be useful to improve insulin secretion in diabetes [44].
Energy balance	SIRT6 is an important molecular regulator for POMC neurons to promote negative energy balance [46].
Other	SIRT6 appears to function as a corepressor of the Hif1α—a critical regulator of nutrient stress responses [41]. Expression of SIRT6 increased upon nutrient deprivation in cultured cells. The increase in SIRT6 levels is due to the stabilization of the SIRT6 protein, and not via an increase in SIRT6 transcription [47].

The "sirtfoods" diet, combing sirtuin-activating foods belonging to both Mediterranean and Asian diets, may be a promising dietary strategy in preventing chronic diseases, thereby ensuring healthy aging [49]. "Sirtfoods" can be found in: olive oil [50]; red wine [51]; grapes [52,53]; apple, strawberries, onion and cabbage [53]; soybeans [54]; tofu [55]; licorice [56]; shallot [56]. Pallauf et al. [49] suggested that omega-3 fatty acids, vitamins and antioxidants do not work in isolation. They should synergistically work to prevent chronic diseases.

5. Inflammation

The role of SIRT6's involvement in inflammation is complex. This protein can have both pro- and anti-inflammatory properties, depending on the type of cells involved [36]. It has been suggested that SIRT6 acts as a pro-inflammatory agent by functioning as a lysine deacetylase, removing fatty acyl modifications from K19 and K20 of TNF-α and thereby promoting the secretion of TNF-α from the cell [57].

A characteristic feature of inflammatory diseases is endothelial dysfunction. Factors associated with this phenomenon include the increased release of pro-inflammatory cytokines, adhesion molecules and tissue matrix-degrading enzymes (collagenases and others). At the transcriptional level, this is regulated by the histone deacetylase SIRT6 through its action on the pro-inflammatory transcription factor nuclear factor-κB (*NF-κB*) [58]. In a study by Lappas et al. [59], the role of SIRT6 in regulating inflammation in endothelial cells was determined. They evaluated markers of inflammation in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) in the presence of lipopolysaccharide (LPS) as a model agent for initiating inflammation. LPS decreased *SIRT6* expression in HUVEC cells, which agrees with previous observations by other authors [60,61]. In contrast, *SIRT6* knockdown increased the expression of a number of pro-inflammatory cytokines (IL-1β, IL-6, IL-8), the COX-prostaglandin system, extracellular matrix remodeling enzymes (MMP-2, MMP-9 and PAI-1), the adhesion molecule ICAM-1 and angiogenesis-related growth factors (VEGF and FGF-2). Knockdown of *SIRT6* increased the expression of *NF-κB*. In contrast, *SIRT6* overexpression was associated with decreased *NF-κB* transcriptional activity. Thus, they indicated that the loss of *SIRT6* in endothelial cells is associated with the up-regulation of genes involved in the progression of inflammation and associated vascular remodeling.

Hence, the authors conclude that the up-regulation of *SIRT6* expression is a potential pharmacological target for drugs that reduce the inflammatory destruction of blood vessels. Such action will have the potential to nullify the negative manifestations of cardiovascular disease, diabetes and a range of neurodegenerative diseases. An extensive discussion of this topic was carried out in the work of Guo et al. [62].

Earlier, the role of LPS was identified as a factor that decreases the expression of *SIRT6*. It is suggested that this mechanism is based on the weakening of NF-κB signaling through H3K39 deacetylation on chromatin. NF-κB is a key factor involved in regulating cell apoptosis, aging, inflammation and immune system function [63]. Hyperactive NF-κB signaling can therefore contribute to both normal and premature aging. Hence, the role of SIRT6 in reducing the activity of this factor is significant [64].

Balestrieri et al. [37] demonstrated reduced *SIRT6* expression and lower interstitial collagen content in cells obtained from homogenates of atherosclerotic plaques from the carotid arteries of people with diabetes compared to plaques obtained from people without diabetes. In addition, plaques obtained from patients with diabetes were characterized by greater inflammation and oxidative stress. Subsequent trials showed that atherosclerotic plaques obtained from diabetic patients treated with GLP-1 (glucagon-like peptide-1 receptor) drugs for 26 ± 8 months indicated higher expression of *SIRT6* and collagen, as well as a lower intensity of inflammation and oxidative stress than cells obtained from untreated patients. This indicates the involvement of SIRT6 in the inflammatory changes of atherosclerotic lesions in diabetes and the role of GLP-1 in modulating it. These results were further supported by observations in an in vitro model. Endothelial progenitor cells (EPCs) and endothelial cells (ECs) were used as model cells. Both types of cells treated with high glucose medium (25 mmol/L) in the presence of GLP-1 (100 nmol/liraglutide) showed higher expression of *SIRT6* and lower expression of nuclear factor-κB compared to control cells (only treated with high glucose). The results obtained by Balestrieri et al. [37] confirmed the controlling involvement of SIRT6 in the inflammatory pathways of diabetic atherosclerotic lesions. From the perspective of skin wellbeing, this is an important observation. The incidence of diabetic complications involving the skin and its appendages is high, and identifying treatment options to nullify the underlying pathomechanism, i.e., vascular destruction, is an important topic here.

The promising role of *SIRT6* regulation is indicated to support the treatment of: atherosclerosis [65]; diabetic atherosclerosis [66]; diabetes-associated inflammatory diseases [67]; diabetic nephropathy [68]; adipose tissue inflammation [69]; oxidative stress in the heart triggered by high-fat diet-induced obesity [70] and osteoarthritis [61,71].

6. Role in the Wound Healing Process

With age, the loss of homeostasis leads to a series of clinical consequences, including impaired wound healing. Macrophages play a key role in wound healing, as they are responsible for suppressing excessive inflammatory states, removing cell debris and initiating and coordinating tissue remodeling and regeneration [72,73]. Activated macrophages can be divided into two phenotypes: M1 (mainly involved in pro-inflammatory responses) and M2 (responsible for anti-inflammatory actions) [19,73].

SIRT6 is considered a key factor in switching macrophage phenotypes and migratory responses, and therefore, it is believed to play a role in the wound healing process [18]. To illustrate the effect of SIRT6 on wound healing, Koo et al. [18] created a mouse model with *SIRT6* deletion (mS6KO). Wounds were excised on the dorsal skin of female mS6KO and control group mice (WT). Slower wound healing was observed in mS6KO mice. Reduced collagen content in the granulation tissue of mS6KO mice was demonstrated, as well as suppressed angiogenesis gene activity in mS6KO mice. Moreover, increased M1 macrophage infiltration with decreased M2 macrophage numbers, as well as more pro-inflammatory cytokines TNF-α, IL-1β and IL-6 were noted. This suggests that the specific deficiency of SIRT6 in bone marrow cells has an impact on the temporal response of the wound healing process by inhibiting epithelial regeneration, angiogenesis and collagen deposition.

Thandavarayan et al. [22] arrived at similar conclusions. In a mouse model with diabetes, they showed that SIRT6 deficiency reduced *VEGF* expression, increased the expression of pro-inflammatory markers (including TNF-α, IL-1β) and intensified oxidative stress when siRNA against *SIRT6* was administered. Yang et al. [74] described the molecular mechanism that connects SIRT6 and angiogenesis.

Furthermore, exogenous substances that are associated with the modification of the intensity of sirtuin expression can affect changes in the rate of wound healing. This issue has been the subject of several research projects [75–79].

Resveratrol, a sirtuin activator, by increasing the proliferation of keratinocytes, accelerates wound healing, while sirtinol, a sirtuin inhibitor, will delay their closure. This suggests the role of administering natural or synthetic *SIRT6* activators as factors accelerating wound healing processes [77].

Flavonoids are polyphenolic secondary metabolites synthesized by fungi and plants; possessing various pharmacological activities. It has been shown that compounds from this group modulate the activity of SIRT6 by altering its structure.

SIRT6 activators presumably bind near the acetylated peptide substrate binding site. Inhibitors, on the other hand, are likely to bind in a way that disrupts NAD^+ binding. Cyanidin is indicated as the strongest SIRT6 activator [80]. Other activators include: N-acetylamines [81], icariin [82], ergothioneine [83]. Significant inhibitory power for SIRT6 activity has been shown for galloylated catechins [80]. Compounds that will exhibit inhibitory activity on SIRT6 activity include quercetin, vitexin [84], peptides containing netioacetylated lysine [85] and EX-527 [86]. The role of SIRT6 in the wound healing process is shown in Figure 3.

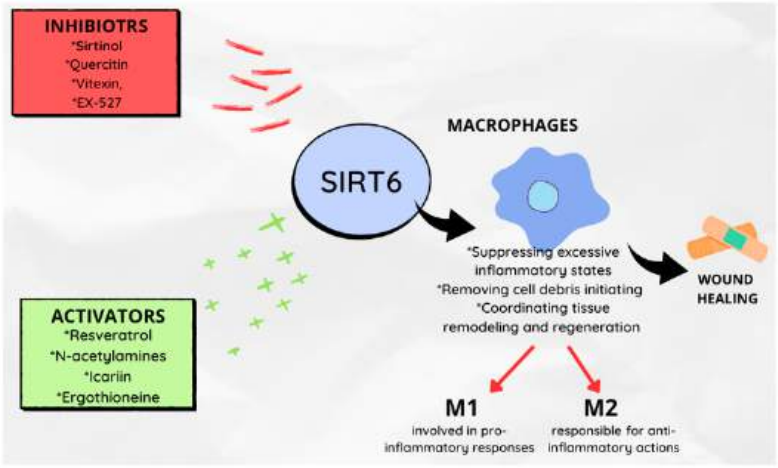


Figure 3. The role of SIRT6 in the wound healing process.

7. Role of Physical Activity

Appropriate levels of physical activity are an important element in preventing premature disability, the progression of various lifestyle diseases and aging. Increasing the endurance capacity of skeletal muscles is a new strategy in the fight against metabolic diseases associated with obesity, and this can be achieved by shifting skeletal muscle fibers towards slow-twitch, oxidative fibers. Aging leads to a gradual decrease in physical activity and disturbances in energy homeostasis. Numerous studies have focused on the correlation between changes in activity levels and *SIRT6* expression [87–92] (Figure 4).

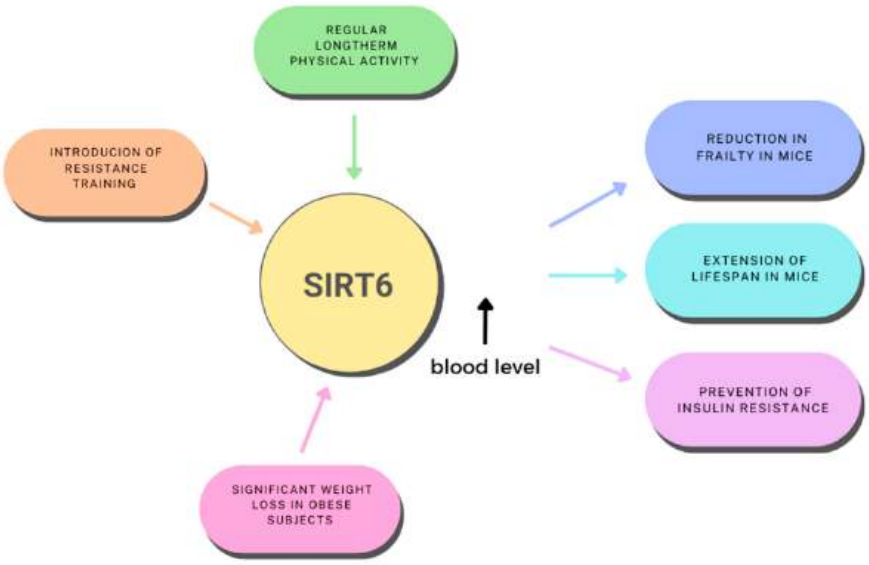


Figure 4. Modifying role of physical activity and the influence of SIRT6 on metabolism based on: [85,88–90].

The expression of *SIRT6* is increased in chronically exercising individuals. Introducing resistance training as a modification of current physical activity allows for an increase in SIRT6 concentration in the blood of older men [65]. A factor that increases *SIRT6* expression is significant weight loss achieved through diet therapy and exercise in morbidly obese individuals [88].

SIRT6 regulates aging and a series of metabolic processes. Roichman et al. [89] showed that *SIRT6* overexpression leads to a reduction in frailty and an extension of lifespan in both male and female mice. Older transgenic *SIRT6* mice maintained normal glucose production in the liver and glucose homeostasis by improving the utilization of two major gluconeogenic precursors, lactate and glycerol. Therefore, *SIRT6* overexpression protected older individuals from impaired carbohydrate homeostasis. The authors indicated that the mechanism of this beneficial phenomenon is associated with increased gene expression for proteins involved in gluconeogenesis in the liver, de novo synthesis of NAD^+ (which is also the basis for the beneficial effects of physical training) and systemically increases the release of glycerol from adipose tissue. SIRT6 optimizes energy homeostasis in older age, which is associated with the carbohydrate theory of aging. It was also noted that it is precisely SIRT6 that mediates the beneficial effect of regular physical activity in preventing insulin resistance [90].

The study by Song et al. [91] indicated that SIRT6 is crucial in regulating the configuration of muscle fibers toward the oxidative type. They also indicated that a SIRT6 activator (MDL801) could produce the same effects as physical training. Genetic inactivation of SIRT6 in skeletal muscle decreased, while its transgenic overexpression increased mitochondrial oxidative capacity and exercise performance in the model animals studied. The authors indicated that the ablation of *SIRT6* in skeletal muscle led to reduced exercise performance. The authors tested the hypothesis that *SIRT6* induction may be mediated by endocrine/paracrine signaling (Il-6 enhanced *SIRT6* expression) and/or a stimulus effect (stimulating the muscle with electrodes also enhanced *SIRT6* expression). *SIRT6* ablation also reduces the number of mitochondria; knockout muscles also had significantly more mitochondria with abnormal structures. Reduced mitochondrial DNA content and

suppressed expression of genes related to mitochondrial biogenesis were observed. The consequence was the suppression of basal, ATP-related and maximal respiration in *SIRT6* knockout mice observed in this study. *SIRT6* ablation impairs the ability to meet the cell's energy needs through oxidative phosphorylation [91].

The mechanism linked *SIRT6* to the downregulation of *Sox6*, a key repressor of the free-fiber-specific gene, by increasing *CREB* transcription. This mechanism demonstrates how suppressed *SIRT6* expression links to the mitochondrial theory of aging in how the beneficial effects of regular physical activity on life extension and quality of life binding can be explained.

It has also been indicated, in studies conducted on young men, that even a single bout of aerobic exercise (at 80% of peak oxygen uptake) will affect the expression of *SIRT6* and telomerase, the enzyme responsible for maintaining the proper length of telomeres protecting the ends of DNA strands [92]. This observation will again allow for linking SIRT6 to the telomeric theory of aging.

8. Conclusions

Research suggests that the activation of *SIRT6* and its role in various biochemical processes may have a positive impact on health and longevity. Several pathomechanisms associated with accelerated aging of the body as a whole, as well as individual systems, could be inhibited by an increased expression of this protein. Modulating SIRT6 activity can therefore be a valuable tool for supporting the treatment of age-related diseases and improving quality of life, thereby contributing to longevity. In addition to well-known lifestyle modifications, such as caloric restriction and intermittent fasting, research is being conducted to identify new pharmacologically active molecules and dietary components with recognized roles in promoting longevity. Furthermore, physical activity might be a valuable tool for modifying and/or modulating SIRT6 for health and longevity. As seen in relation to the presented results in this review, not all aspects related to the activity of SIRT6 are fully understood. Hence, there is a necessity and need for systematic, controlled research into this continually emerging area of investigation.

Author Contributions: Conceptualization, A.P., W.P. and A.D.; methodology, A.P. and M.Ż.; software, O.C.-L.; validation, M.Ż., O.C.-L. and A.P.; formal analysis, A.D.; investigation, A.D.; resources, A.D.; data curation, A.D.; writing—original draft preparation, A.D.; writing—review and editing, A.P., O.C.-L. and M.Ż.; visualization, A.D.; supervision, W.P.; project administration, O.C.-L.; funding acquisition, A.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding, the APC fee was funded by a grant 318/BS/INP/2023 University of Physical Education in Krakow, Poland.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

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

References

1. Haigis, M.C.; Sinclair, D.A. Mammalian Sirtuins: Biological Insights and Disease Relevance. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **2010**, *5*, 253–295. [CrossRef]
2. Carafa, V.; Rotili, D.; Forgione, M.; Cuomo, F.; Serretiello, E.; Hailu, G.S.; Jarho, E.; Lahtela-Kakkonen, M.; Mai, A.; Altucci, L. Sirtuin Functions and Modulation: From Chemistry to the Clinic. *Clin. Epigenetics* **2016**, *8*, 61. [CrossRef]
3. Frydzińska, Z.; Owczarek, A.; Winiarska, K. Sirtuiny i Ich Rola w Regulacji Metabolizmu. *Postep. Biochem.* **2019**, *65*, 31–40. [CrossRef]
4. Jing, H.; Lin, H. Sirtuins in Epigenetic Regulation. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 2350–2375. [CrossRef]
5. Sinclair, D.A.; Guarente, L. Extrachromosomal RDNA Circles-A Cause of Aging in Yeast. *Cell* **1997**, *91*, 1033–1042. [CrossRef]
6. Sharma, A.; Diecke, S.; Zhang, W.Y.; Lan, F.; He, C.; Mordwinkin, N.M.; Chua, K.F.; Wu, J.C. The Role of SIRT6 Protein in Aging and Reprogramming of Human Induced Pluripotent Stem Cells. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 18439–18447. [CrossRef]

7. Madsen, A.S.; Andersen, C.; Daoud, M.; Anderson, K.A.; Laursen, J.S.; Chakladar, S.; Huynh, F.K.; Colaço, A.R.; Backos, D.S.; Fristrup, P.; et al. Investigating the Sensitivity of NAD+-Dependent Sirtuin Deacylation Activities to NADH. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 7128–7141. [CrossRef]
8. Kanfi, Y.; Naiman, S.; Amir, G.; Peshti, V.; Zinman, G.; Nahum, L.; Bar-Joseph, Z.; Cohen, H.Y. The Sirtuin SIRT6 Regulates Lifespan in Male Mice. *Nature* **2012**, *483*, 218–221. [CrossRef]
9. Vitiello, M.; Zullo, A.; Servillo, L.; Mancini, F.P.; Borriello, A.; Giovane, A.; Della Ragione, F.; D'Onofrio, N.; Balestrieri, M.L. Multiple Pathways of SIRT6 at the Crossroads in the Control of Longevity, Cancer, and Cardiovascular Diseases. *Ageing Res. Rev.* **2017**, *35*, 301–311. [CrossRef]
10. Ran, L.K.; Chen, Y.; Zhang, Z.Z.; Tao, N.N.; Ren, J.H.; Zhou, L.; Tang, H.; Chen, X.; Chen, K.; Li, W.Y.; et al. SIRT6 Overexpression Potentiates Apoptosis Evasion in Hepatocellular Carcinoma via BCL2-Associated X Protein-Dependent Apoptotic Pathway. *Clin. Cancer Res.* **2016**, *22*, 3372–3382. [CrossRef]
11. Dominy, J.E.; Lee, Y.; Jedrychowski, M.P.; Chim, H.; Jurczak, M.J.; Camporez, J.P.; Ruan, H.B.; Feldman, J.; Pierce, K.; Mostoslavsky, R.; et al. The Deacetylase Sirt6 Activates the Acetyltransferase GCN5 and Suppresses Hepatic Gluconeogenesis. *Mol. Cell* **2012**, *48*, 900–913. [CrossRef]
12. Elbarbary, R.A.; Lucas, B.A.; Maquat, L.E. Retrotransposons as Regulators of Gene Expression. *Science* **2016**, *351*, 6274. [CrossRef]
13. Imai, S.i.; Guarente, L. NAD+ and Sirtuins in Aging and Disease. *Trends Cell Biol.* **2014**, *24*, 464–471. [CrossRef]
14. Tennen, R.I.; Chua, K.F. Chromatin Regulation and Genome Maintenance by Mammalian SIRT6. *Trends Biochem. Sci.* **2011**, *36*, 39–46. [CrossRef]
15. Mahlknecht, U.; Ho, A.; Volter-Mahlknecht, S. Chromosomal Organization and Fluorescence in Situhybridization of the Human Sirtuin 6 Gene. *Int. J. Oncol.* **2006**, *28*, 447–456.
16. Gertler, A.A.; Cohen, H.Y. SIRT6, a Protein with Many Faces. *Biogerontology* **2013**, *14*, 629–639. [CrossRef]
17. Bielawski, A.; Nalepa, I. Sirtuins—Intriguing multi-tasking "keepers" of life processes. *Wszechświat* **2019**, *20*, 4–6.
18. Koo, J.H.; Jang, H.Y.; Lee, Y.; Moon, Y.J.; Bae, E.J.; Yun, S.K.; Park, B.H. Myeloid Cell-Specific Sirtuin 6 Deficiency Delays Wound Healing in Mice by Modulating Inflammation and Macrophage Phenotypes. *Exp. Mol. Med.* **2019**, *51*, 1–10. [CrossRef]
19. Yunna, C.; Mengru, H.; Lei, W.; Weidong, C. Macrophage M1/M2 Polarization. *Eur. J. Pharmacol.* **2020**, *877*, 173090. [CrossRef]
20. Chang, A.R.; Ferrer, C.M.; Mostoslavsky, R. SIRT6, a Mammalian Deacylase with Multitasking Abilities. *Physiol. Rev.* **2020**, *100*, 145–169. [CrossRef]
21. Pan, H.; Guan, D.; Liu, X.; Li, J.; Wang, L.; Wu, J.; Zhou, J.; Zhang, W.; Ren, R.; Zhang, W.; et al. SIRT6 Safeguards Human Mesenchymal Stem Cells from Oxidative Stress by Coactivating NRF2. *Cell Res.* **2016**, *26*, 190–205. [CrossRef]
22. Thandavarayan, R.A.; Garikipati, V.N.S.; Joladarashi, D.; Suresh Babu, S.; Jeyabal, P.; Verma, S.K.; Mackie, A.R.; Khan, M.; Arumugam, S.; Watanabe, K.; et al. Sirtuin-6 Deficiency Exacerbates Diabetes-Induced Impairment of Wound Healing. *Exp. Dermatol.* **2015**, *24*, 773–778. [CrossRef]
23. Itoh, K.; Tong, K.I.; Yamamoto, M. Molecular Mechanism Activating Nrf2-Keap1 Pathway in Regulation of Adaptive Response to Electrophiles. *Free. Radic. Biol. Med.* **2004**, *36*, 1208–1213. [CrossRef]
24. Kanwal, A.; Pillai, V.B.; Gupta, M.P. The Nuclear and Mitochondrial Sirtuins, Sirt6 and Sirt3, Regulate each others' Activity and Protect the Heart from Developing Obesity-Mediated Diabeticcardiomyopathy. *J. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **2020**, *34*, 14057.
25. Dziechciaż, M.; Filip, R. Biological Psychological and Social Determinants of Old Age: Bio-Psycho-Social Aspects of Human Aging. *Ann. Agric. Environ. Med.* **2014**, *21*, 835–838. [CrossRef]
26. López-Otín, C.; Blasco, M.A.; Partridge, L.; Serrano, M.; Kroemer, G. The Hallmarks of Aging. *Cell* **2013**, *153*, 1194. [CrossRef]
27. Franco, A.C.; Aveleira, C.; Cavadas, C. Skin Senescence: Mechanisms and Impact on Whole-Body Aging. *Trends Mol. Med.* **2022**, *28*, 97–109. [CrossRef]
28. Mao, Z.; Hine, C.; Tian, X.; Van Meter, M.; Au, M.; Vaidya, A.; Seluanov, A.; Gorbunova, V. SIRT6 Promotes DNA Repair under Stress by Activating PARP1. *Science* **2011**, *332*, 1443–1446. [CrossRef]
29. Cardus, A.; Uryga, A.K.; Walters, G.; Erusalimsky, J.D. SIRT6 Protects Human Endothelial Cells from DNA Damage, Telomere Dysfunction, and Senescence. *Cardiovasc. Res.* **2013**, *97*, 571–579. [CrossRef]
30. Mostoslavsky, R.; Chua, K.F.; Lombard, D.B.; Pang, W.W.; Fischer, M.R.; Gellon, L.; Liu, P.; Mostoslavsky, G.; Franco, S.; Murphy, M.M.; et al. Genomic Instability and Aging-like Phenotype in the Absence of Mammalian SIRT6. *Cell* **2006**, *124*, 315–329. [CrossRef]
31. Tower, J. Sex-Specific Gene Expression and Life Span Regulation. *Trends Endocrinol. Metab.* **2017**, *28*, 735–747. [CrossRef]
32. Bétry, C.; Meugnier, E.; Pflieger, M.; Grenet, G.; Hercberg, S.; Galan, P.; Kesse-Guyot, E.; Vidal, H.; Laville, M. High Expression of CPT1b in Skeletal Muscle in Metabolically Healthy Older Subjects. *Diabetes Metab.* **2019**, *45*, 152–159. [CrossRef]
33. Smirnov, D.; Eremenko, E.; Stein, D.; Kaluski, S.; Jasinska, W.; Cosentino, C.; Martinez-Pastor, B.; Brotman, Y.; Mostoslavsky, R.; Khrameeva, E.; et al. SIRT6 Is a Key Regulator of Mitochondrial Function in the Brain. *Cell Death Dis.* **2023**, *14*, 35. [CrossRef]
34. Shay, J.W. Telomeres and Aging. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2018**, *52*, 1–7. [CrossRef]
35. Michishita, E.; McCord, R.A.; Berber, E.; Kioi, M.; Padilla-Nash, H.; Damian, M.; Cheung, P.; Kusumoto, R.; Kawahara, T.L.A.; Barrett, J.C.; et al. SIRT6 Is a Histone H3 Lysine 9 Deacetylase That Modulates Telomeric Chromatin. *Nature* **2008**, *452*, 492–496. [CrossRef]
36. Kugel, S.; Mostoslavsky, R. Chromatin and beyond: The Multitasking Roles for SIRT6. *Trends Biochem. Sci.* **2014**, *39*, 72–81. [CrossRef]

37. Balestrieri, M.L.; Rizzo, M.R.; Barbieri, M.; Paolisso, P.; D'onofrio, N.; Giovane, A.; Siniscalchi, M.; Minicucci, F.; Sardu, C.; D'andrea, D.; et al. Sirtuin 6 Expression and Inflammatory 7 Activity in Diabetic Atherosclerotic Plaques: Effects of Incretin Treatment. *Diabetes* **2015**, *64*, 1395–1406. [CrossRef]
38. Van Meter, M.; Kashyap, M.; Rezazadeh, S.; Geneva, A.J.; Morello, T.D.; Seluanov, A.; Gorbunova, V. SIRT6 Represses LINE1 Retrotransposons by Ribosylating KAP1 but This Repression Fails with Stress and Age. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 5011. [CrossRef]
39. Gruber, F.; Kremslehner, C.; Eckhart, L.; Tschachler, E. Cell Aging and Cellular Senescence in Skin Aging—Recent Advances in Fibroblast and Keratinocyte Biology. *Exp. Gerontol.* **2020**, *130*, 110780. [CrossRef]
40. Kanfi, Y.; Peshti, V.; Gil, R.; Naiman, S.; Nahum, L.; Levin, E.; Kronfeld-Schor, N.; Cohen, H.Y. SIRT6 Protects against Pathological Damage Caused by Diet-Induced Obesity. *Aging Cell* **2010**, *9*, 162–173. [CrossRef]
41. Zhong, L.; D'Urso, A.; Toiber, D.; Sebastian, C.; Henry, R.E.; Vadysirisack, D.D.; Guimaraes, A.; Marinelli, B.; Wikstrom, J.D.; Nir, T.; et al. The Histone Deacetylase Sirt6 Regulates Glucose Homeostasis via Hif1α. *Cell* **2010**, *140*, 280–293. [CrossRef]
42. Kim, H.S.; Xiao, C.; Wang, R.H.; Lahusen, T.; Xu, X.; Vassilopoulos, A.; Vazquez-Ortiz, G.; Jeong, W.I.; Park, O.; Ki, S.H.; et al. Hepatic-Specific Disruption of SIRT6 in Mice Results in Fatty Liver Formation Due to Enhanced Glycolysis and Triglyceride Synthesis. *Cell Metab.* **2010**, *12*, 224–236. [CrossRef]
43. Houtkooper, R.H.; Pirinen, E.; Auwerx, J. Sirtuins as Regulators of Metabolism and Healthspan. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2012**, *13*, 225–238. [CrossRef]
44. Xiong, X.; Wang, G.; Tao, R.; Wu, P.; Kono, T.; Li, K.; Ding, W.X.; Tong, X.; Tersey, S.A.; Harris, R.A.; et al. Sirtuin 6 Regulates Glucose-Stimulated Insulin Secretion in Mouse Pancreatic Beta Cells. *Diabetologia* **2016**, *59*, 151–160. [CrossRef]
45. Kuang, J.; Zhang, Y.; Liu, Q.; Shen, J.; Pu, S.; Cheng, S.; Chen, L.; Li, H.; Wu, T.; Li, R.; et al. Fat-Specific Sirt6 Ablation Sensitizes Mice to High-Fat Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance by Inhibiting Lipolysis. *Diabetes* **2017**, *66*, 1159–1171. [CrossRef]
46. Tang, Q.; Gao, Y.; Liu, Q.; Yang, X.; Wu, T.; Huang, C.; Huang, Y.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Li, R.; et al. Sirt6 in Pro-Opiomelanocortin Neurons Controls Energy Metabolism by Modulating Leptin Signaling. *Mol. Metab.* **2020**, *37*, 100994. [CrossRef]
47. Kanfi, Y.; Shalman, R.; Peshti, V.; Pilosof, S.N.; Gozlan, Y.M.; Pearson, K.J.; Lerrer, B.; Moazed, D.; Marine, J.C.; de Cabo, R.; et al. Regulation of SIRT6 Protein Levels by Nutrient Availability. *FEBS Lett.* **2008**, *582*, 543–548. [CrossRef]
48. Mccay, C.M.; Crowell, M.F.; Maynard, L.A. The Effect of Retarded Growth upon the Length of Life Span and upon the Ultimate Body Size. 1935. *Nutrition* **1989**, *5*, 155–171.
49. Pallauf, K.; Giller, K.; Huebbe, P.; Rimbach, G. Nutrition and Healthy Ageing: Calorie Restriction or Polyphenol-Rich "Mediter-rAsian" Diet? *Oxid. Med. Cell Longev.* **2013**, *2013*, 707421. [CrossRef]
50. Menendez, J.A.; Joven, J.; Aragonès, G.; Barrajón-Catalán, E.; Beltrán-Debón, R.; Borrás-Linares, I.; Camps, J.; Corominas-Faja, B.; Cufí, S.; Fernández-Arroyo, S.; et al. Xenohormetic and Anti-Aging Activity of Secoiridoid Polyphenols Present in Extra Virgin Olive Oil: A New Family of Gerosuppressant Agents. *Cell Cycle* **2013**, *12*, 555–578. [CrossRef]
51. Howitz, K.T.; Bitterman, K.J.; Cohen, H.Y.; Lamming, D.W.; Lavu, S.; Wood, J.G.; Zipkin, R.E.; Chung, P.; Kisielewski, A.; Zhang, L.-L.; et al. Small Molecule Activators of Sirtuins Extend Saccharomyces Cerevisiae Lifespan. *Nature* **2003**, *425*, 191–196. [CrossRef]
52. Guerrero, R.F.; Puertas, B.; Fernández, M.I.; Palma, M.; Cantos-Villar, E. Induction of Stilbenes in Grapes by UV-C: Comparison of Different Subspecies of Vitis. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2010**, *11*, 231–238. [CrossRef]
53. Arai, Y.; Watanabe, S.; Kimira, M.; Shimoi, K.; Mochizuki, R.; Kinae, N. Human Nutrition and Metabolism Dietary Intakes of Flavonols, Flavones and Isoflavones by Japanese Women and the Inverse Correlation between Quercetin Intake and Plasma LDL Cholesterol Concentration 1. *J. Nutr.* **2000**, *130*, 2243–2250. [CrossRef]
54. Rasbach, K.A.; Schnellmann, R.G. Isoflavones Promote Mitochondrial Biogenesis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2008**, *325*, 536–543. [CrossRef]
55. Song, T.; Barua, K.; Buseman, G.; Murphy, P. Soy Isoflavone Analysis: Quality Control and a New Internalstandard. *Am. J. Clin. Nutr.* **1998**, *68*, 1474–1479. [CrossRef]
56. Hsu, Y.L.; Chia, C.C.; Chen, P.J.; Huang, S.E.; Huang, S.C.; Kuo, P.L. Shallot and Licorice Constituent Isoliquiritigenin Arrests Cell Cycle Progression and Induces Apoptosis through the Induction of ATM/P53 and Initiation of the Mitochondrial System in Human Cervical Carcinoma HeLa Cells. *Mol. Nutr. Food Res.* **2009**, *53*, 826–835. [CrossRef]
57. Jiang, H.; Khan, S.; Wang, Y.; Charron, G.; He, B.; Sebastian, C.; Du, J.; Kim, R.; Ge, E.; Mostoslavsky, R.; et al. SIRT6 Regulates TNF-α Secretion through Hydrolysis of Long-Chain Fatty Acyl Lysine. *Nature* **2013**, *496*, 110–113. [CrossRef]
58. Mendes, K.L.; Lelis, D.d.F.; Santos, S.H.S. Nuclear Sirtuins and Inflammatory Signaling Pathways. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2017**, *38*, 98–105. [CrossRef]
59. Lappas, M. Anti-Inflammatory Properties of Sirtuin 6 in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Mediat. Inflamm.* **2012**, *2012*, 597514. [CrossRef]
60. Zhang, Y.; Wang, L.; Meng, L.; Cao, G.; Wu, Y. Sirtuin 6 Overexpression Relieves Sepsis-Induced Acute Kidney Injury by Promoting Autophagy. *Cell Cycle* **2019**, *18*, 425–436. [CrossRef]
61. Chen, J.; Chen, S.; Cai, D.; Wang, Q.; Qin, J. The Role of Sirt6 in Osteoarthritis and Its Effect on Macrophage Polarization. *Bioengineered* **2022**, *13*, 9677–9689. [CrossRef]
62. Guo, Z.; Li, P.; Ge, J.; Li, H. SIRT6 in Aging, Metabolism, Inflammation and Cardiovascular Diseases. *Aging Dis.* **2022**, *13*, 1787–1822. [CrossRef]

63. Yu, H.; Lin, L.; Zhang, Z.; Zhang, H.; Hu, H. Targeting NF-KB Pathway for the Therapy of Diseases: Mechanism and Clinical Study. *Signal Transduct Target Ther.* **2020**, *5*, 209. [CrossRef]
64. Kawahara, T.L.A.; Michishita, E.; Adler, A.S.; Damian, M.; Berber, E.; Lin, M.; McCord, R.A.; Ongaigui, K.C.L.; Boxer, L.D.; Chang, H.Y.; et al. SIRT6 Links Histone H3 Lysine 9 Deacetylation to NF-KB-Dependent Gene Expression and Organismal Life Span. *Cell* **2009**, *136*, 62–74. [CrossRef]
65. Xia, W.; Xiao, J.; Tong, C.L.; Lu, J.; Tu, Y.; Li, S.; Ni, L.; Shi, Y.; Luo, P.; Zhang, X.; et al. Orientin Inhibits Inflammation in Chondrocytes and Attenuates Osteoarthritis through Nrf2/NF-KB and SIRT6/NF-KB Pathway. *J. Orthop. Res.* **2023**, 1–13. [CrossRef]
66. Zhao, Y.; Jia, X.; Yang, X.; Bai, X.; Lu, Y.; Zhu, L.; Cheng, W.; Shu, M.; Zhu, Y.; Du, X.; et al. Deacetylation of Caveolin-1 by Sirt6 Induces Autophagy and Retards High Glucose-Stimulated LDL Transcytosis and Atherosclerosis Formation. *Metabolism* **2022**, *131*, 155162. [CrossRef]
67. Li, B.; Xin, Z.; Gao, S.; Li, Y.; Guo, S.; Fu, Y.; Xu, R.; Wang, D.; Cheng, J.; Liu, L.; et al. SIRT6-Regulated Macrophage Efferocytosis Epigenetically Controls Inflammation Resolution of Diabetic Periodontitis. *Theranostics* **2023**, *13*, 231–249. [CrossRef]
68. Wang, Z.; Wu, Q.; Wang, H.; Gao, Y.; Nie, K.; Tang, Y.; Su, H.; Hu, M.; Gong, J.; Fang, K.; et al. Diosgenin Protects against Podocyte Injury in Early Phase of Diabetic Nephropathy through Regulating SIRT6. *Phytomedicine* **2022**, *104*, 154276. [CrossRef]
69. Bae, E.J.; Park, B.-H. Multiple Roles of Sirtuin 6 in Adipose Tissue Inflammation. *Diabetes Metab. J.* **2023**, *47*, 164–172. [CrossRef]
70. Gao, S.; Yang, Q.; Peng, Y.; Kong, W.; Liu, Z.; Li, Z.; Chen, J.; Bao, M.; Li, X.; Zhang, Y.; et al. SIRT6 Regulates Obesity-Induced Oxidative Stress via ENDOG/SOD2 Signaling in the Heart. *Cell Biol. Toxicol.* **2022**. [CrossRef]
71. Ji, M.L.; Jiang, H.; Li, Z.; Geng, R.; Hu, J.Z.; Lin, Y.C.; Lu, J. Sirt6 Attenuates Chondrocyte Senescence and Osteoarthritis Progression. *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 7658. [CrossRef] [PubMed]
72. Kim, S.Y.; Nair, M.G. Macrophages in Wound Healing: Activation and Plasticity. *Immunol. Cell Biol.* **2019**, *97*, 258–267. [CrossRef] [PubMed]
73. Delavary, B.M.; van der Veer, W.M.; van Egmond, M.; Niessen, F.B.; Beelen, R.H.J. Macrophages in Skin Injury and Repair. *Immunobiology* **2011**, *216*, 753–762. [CrossRef] [PubMed]
74. Yang, Z.; Huang, Y.; Zhu, L.; Yang, K.; Liang, K.; Tan, J.; Yu, B. SIRT6 Promotes Angiogenesis and Hemorrhage of Carotid Plaque via Regulating HIF-1α and Reactive Oxygen Species. *Cell Death Dis.* **2021**, *12*, 77. [CrossRef]
75. Zhang, P.; He, L.; Zhang, J.; Mei, X.; Zhang, Y.; Tian, H.; Chen, Z. Preparation of Novel Berberine Nano-Colloids for Improving Wound Healing of Diabetic Rats by Acting Sirt1/NF-KB Pathway. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2020**, *187*, 110647. [CrossRef]
76. Jiang, X.; Yao, Z.; Wang, K.; Lou, L.; Xue, K.; Chen, J.; Zhang, G.; Zhang, Y.; Du, J.; Lin, C.; et al. MDL-800, the SIRT6 Activator, Suppresses Inflammation via the NF- κ B Pathway and Promotes Angiogenesis to Accelerate Cutaneous Wound Healing in Mice. Oxid. *Med. Cell Longev.* **2022**, *2022*, 1619651. [CrossRef]
77. Spallotta, F.; Cencioni, C.; Straino, S.; Nanni, S.; Rosati, J.; Artuso, S.; Manni, I.; Colussi, C.; Piaggio, G.; Martelli, F.; et al. A Nitric Oxide-Dependent Cross-Talk between Class i and III Histone Deacetylases Accelerates Skin Repair. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 11004–11012. [CrossRef]
78. O'Connor, M.; Wang, J.V.; Saedi, N. Whole- and Partial-Body Cryotherapy in Aesthetic Dermatology: Evaluating a Trendy Treatment. *J. Cosmet. Dermatol.* **2019**, *18*, 1435–1437. [CrossRef]
79. Huang, X.; Sun, J.; Chen, G.; Niu, C.; Wang, Y.; Zhao, C.; Sun, J.; Huang, H.; Huang, S.; Liang, Y.; et al. Resveratrol Promotes Diabetic Wound Healing via SIRT1-FoxO1-c-Myc Signaling Pathway-Mediated Angiogenesis. *Front. Pharmacol.* **2019**, *10*, 421. [CrossRef]
80. Rahnasto-Rilla, M.; Tyni, J.; Huovinen, M.; Jarho, E.; Kulikowicz, T.; Ravichandran, S.; Bohr, V.A.; Ferrucci, L.; Lahtela-Kakkonen, M.; Moaddel, R. Natural Polyphenols as Sirtuin 6 Modulators. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 4163. [CrossRef]
81. Rahnasto-Rilla, M.; Kokkola, T.; Jarho, E.; Lahtela-Kakkonen, M.; Moaddel, R. N-Acylethanolamines Bind to SIRT6. *ChemBioChem* **2016**, *17*, 77–81. [CrossRef] [PubMed]
82. Chen, Y.; Sun, T.; Wu, J.; Kalionis, B.; Zhang, C.; Yuan, D.; Huang, J.; Cai, W.; Fang, H.; Xia, S. Icariin Intervenes in Cardiac Inflammaging through Upregulation of Sirt6 Enzyme Activity and Inhibition of the NF-Kappa B Pathway. *Biomed. Res. Int.* **2015**, *2015*, 895976. [CrossRef]
83. D'Onofrio, N.; Servillo, L.; Giovane, A.; Casale, R.; Vitiello, M.; Marfella, R.; Paolisso, G.; Balestrieri, M.L. Ergothioneine Oxidation in the Protection against High-Glucose Induced Endothelial Senescence: Involvement of SIRT1 and SIRT6. *Free. Radic. Biol. Med.* **2016**, *96*, 211–222. [CrossRef]
84. Yasuda, M.; Wilson, D.R.; Fugmann, S.D.; Moaddel, R. Synthesis and Characterization of SIRT6 Protein Coated Magnetic Beads: Identification of a Novel Inhibitor of SIRT6 Deacetylase from Medicinal Plant Extracts. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 7400–7407. [CrossRef]
85. Kokkonen, P.; Rahnasto-Rilla, M.; Kiviranta, P.H.; Huhtiniemi, T.; Laitinen, T.; Poso, A.; Jarho, E.; Lahtela-Kakkonen, M. Peptides and Pseudopeptides as SIRT6 Deacetylation Inhibitors. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 969–974. [CrossRef] [PubMed]
86. Kokkonen, P.; Rahnasto-Rilla, M.; Mellini, P.; Jarho, E.; Lahtela-Kakkonen, M.; Kokkola, T. Studying SIRT6 Regulation Using H3K56 Based Substrate and Small Molecules. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2014**, *63*, 71–76. [CrossRef] [PubMed]
87. Hooshmand-Moghadam, B.; Eskandari, M.; Golestani, F.; Rezae, S.; Mahmoudi, N.; Gaeini, A.A. The Effect of 12-Week Resistance Exercise Training on Serum Levels of Cellular Aging Process Parameters in Elderly Men. *Exp. Gerontol.* **2020**, *141*, 111090. [CrossRef]

88. Moschen, A.R.; Wieser, V.; Gerner, R.R.; Bichler, A.; Enrich, B.; Moser, P.; Ebenbichler, C.F.; Kaser, S.; Tilg, H. Adipose Tissue and Liver Expression of SIRT1, 3, and 6 Increase after Extensive Weight Loss in Morbid Obesity. *J. Hepatol.* **2013**, *59*, 1315–1322. [CrossRef]
89. Roichman, A.; Elhanati, S.; Aon, M.A.; Abramovich, I.; Di Francesco, A.; Shahar, Y.; Avivi, M.Y.; Shurgi, M.; Rubinstein, A.; Wiesner, Y.; et al. Restoration of Energy Homeostasis by SIRT6 Extends Healthy Lifespan. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 3208. [CrossRef]
90. Zhang, Y.; Yang, Z.; Xu, Z.; Wan, J.; Hua, T.; Sun, Q. Exercise Ameliorates Insulin Resistance and Improves Sirt6-Mediated Insulin Signaling Transduction in Liver of Obese Rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **2021**, *99*, 506–511. [CrossRef]
91. Song, M.Y.; Han, C.Y.; Moon, Y.J.; Lee, J.H.; Bae, E.J.; Park, B.H. Sirt6 Reprograms Myofibers to Oxidative Type through CREB-Dependent Sox6 Suppression. *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 1808. [CrossRef] [PubMed]
92. Chilton, W.L.; Marques, F.Z.; West, J.; Kannourakis, G.; Berzins, S.P.; O'Brien, B.J.; Charchar, F.J. Acute Exercise Leads to Regulation of Telomere-Associated Genes and Microrna Expression in Immune Cells. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e92088. [CrossRef] [PubMed]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Publikacja nr 3 ***Leptyna w otyłości - możliwości terapeutyczne***

Adrianna Dzidek[1], Anna Piotrowska[2]

Leptyna w otyłości – możliwości terapeutyczne

1. Wstęp i cel

Otyłość i związane z nią schorzenia stały się globalnym problemem medycznym – w 2022r. 43% osób dorosłych charakteryzowało się nadwagą a 16% otyłością. Według WHO (ang. *World Health Organization*, Światowa Organizacja Zdrowia) otyłość definiuje się jako „*nieprawidłowe lub nadmierne gromadzenie się tkanki tłuszczowej, które może mieć niekorzystny wpływ na zdrowie*". Podstawową przyczyną otyłości jest brak równowagi pomiędzy kaloriami spożywanymi a wydatkowanymi. Nadwagę i otyłość, uważane dawniej za problem krajów o wysokich dochodach, coraz częściej obserwuje się obecnie w krajach o dochodach średnich oraz niskich. Nierzadko zdarza się, że otyłość paradoksalnie współistnieje z niedożywieniem w tym samym kraju, społeczności czy nawet w tym samym gospodarstwie domowym [1].

Rozwojowi otyłości sprzyja coraz częściej występujący siedzący tryb życia, brak aktywności fizycznej oraz spożywanie produktów o dużej zawartości energii w postaci cukrów prostych oraz tłuszczów [1]. Czynniki te obserwowano zwłaszcza w okresie pandemii Covid-19 [2,3]. Ponadto wskazuje się także inne czynniki predysponujące do otyłości, niezależne od bilansu kalorycznego, takie jak: wpływ neuroendokrynnej aktywności mózgu, zmiany ilościowe i jakościowe mikrobioty jelitowej czy zmniejszenie masy mięśniowej i siły [4].

Nadmierne otłuszczenie organizmu jest znanym czynnikiem ryzyka wystąpienia szeregu chorób cywilizacyjnych, do których zaliczyć można przede wszystkim: nadciśnienie tętnicze, chorobę niedokrwienną serca [5], cukrzycę typu 2 i inne zaburzenia metabolizmu węglowodanów [6], stłuszczenie wątroby [7], bezdech senny [8], łuszczycowe zapalenie stawów [9], zaburzenia miesiączkowania (prowadzące do braku owulacji i bezpłodności) [10] oraz niektóre rodzaje nowotworów (m.in. nerek, trzustki, żołądka, jelita grubego, piersi, jajnika, pęcherzyka żółciowego i tarczycy) [11]. Wszystkie te choroby mogą prowadzić w bliższej lub dalszej perspektywie czasu do zwiększonego ryzyka śmierci [5]. Pogłębiający się kryzys zdrowotny, jakim jest otyłość, odwraca niedawny wzrost średniej długości życia i stanowi ogromne obciążenie dla systemów opieki zdrowotnej. Wskazuje się także na duże obciążenie ekonomiczne i gospodarcze – opuszczone dni w pracy spowodowane chorobą [12,13].

Otyłość to nie tylko zwiększona ilość tkanki tłuszczowej, ale także zwiększone uwalnianie adipokin do krwiobiegu. Ze względu na ogólnoświatowy problem otyłości, adipokiny zyskują coraz większe znaczenie w diagnostyce i nowych strategiach farmakologicznych tej jednostki chorobowej [14].

---

[1] adrianna.dzidek@doctoral.awf.krakow.pl, Szkoła Doktorska Nauk o Kulturze Fizycznej, Wydział Rehabilitacji Ruchowej, Akademia Wychowania im. Bronisława Czecha w Krakowie
[2] anna.piotrowska@awf.krakow.pl Zakład Chemii i Biochemii, Instytut Nauk Podstawowych, Wydział Rehabilitacji Ruchowej, Akademia Wychowania Fizycznego im. Bronisława Czecha w Krakowie

2. Materiał i metoda

Dokonano przeglądu artykułów naukowych o charakterze przeglądowym oraz badawczym z lat 2017-2024. Przegląd oparto na pozycjach wyszukanych przy pomocy bibliometrycznej bazy danych PUBMED. Wyselekcjonowanie odpowiednich pozycji naukowych było możliwe dzięki zastosowaniu słów kluczy: otyłość (ang. *obesity*), tkanka tłuszczowa (ang. *adipose tissue*), adipokiny (ang. *adipokines*), leptyna (ang. *leptin*). Kryterium włączenia stanowił język (włączono prace napisane w języku polskim i angielskim) oraz dostępność do pełnej wersji publikacji naukowej. Prócz opisu pierwszych badań dotyczących leptyny, nie omawiano badań prowadzonych w modelu zwierzęcym.

3. Wyniki

3.1. Tkanka tłuszczowa

Tkanka tłuszczowa (AT, ang. *adipose tissue*) jest dynamicznym narządem, rozmieszczonym w całym organizmie. Należy do grupy tkanek łącznych, mających zapewnić spójność narządom i układom [15,16]. Zbudowana jest z komórek tłuszczowych – adipocytów, preadipocytów i komórek układu odpornościowego. Nieustannie ulega przebudowie, posiada niemal nieograniczoną zdolność do rozszerzania się w czasie otyłości [16,17]. Stanowi od 20-28% masy ciała zdrowych osób, w zależności od płci i stanu energetycznego. W otyłości może stanowić do 80% masy ciała [15].

Tkanka tłuszczowa, oprócz regulowania homeostazy energetycznej, pełni funkcję ochraniającą mechanicznie narządy, sama jest także narządem endokrynnym. Wydziela cytokiny zwane adipokinami, które wpływają na funkcje szeregu tkanek oraz całego organizmu [18–21].

Wyróżniono białą tkankę tłuszczową (WAT, *ang. white adipose tissue*) oraz brązową tkankę tłuszczową (BAT, *ang. brown adipose tissue*). Największa część AT to WAT, która składa się głównie z adipocytów, ale zawiera również preadipocyty, fibroblasty, komórki odpornościowe oraz komórki naczyniowe [15, 16, 22]. WAT znajduje się w głównych narządach i naczyniach krwionośnych w jamie brzusznej oraz w tkance podskórnej i wytwarza dużą liczbę adipokin i lipokin [15]. BAT stanowi średnio 4,3% całej AT u osoby dorosłej i można ją znaleźć w odcinku szyjnym, nadobojczykowym, pachowym, przykręgosłupowym, śródpiersiowym oraz w złogach brzusznych. Pełni funkcję ochronną przed hipotermią, poprzez rozpraszanie energii w postaci ciepła (termogeneza). Wskazuje się także na działanie BAT przeciw otyłości i cukrzycy [15, 16, 23].

Otyłość powoduje przewlekły stan zapalny tkanki tłuszczowej o niskim nasileniu. W obrazie otyłości, AT może się rozszerzać poprzez powiększenie istniejących adipocytów (hipertrofia) lub poprzez zwiększenie liczby adipocytów (hiperplazja). Maksymalna hipertrofia może skutkować wyczerpaniem zdolności magazynowania lipidów w adipocytach i wywołać ektopowe magazynowanie tłuszczu w innych narządach, takich jak wątroba, przyczyniając się tym samym do rozwoju zespołu metabolicznego. Ponadto, zwiększone magazynowanie lipidów powoduje niedotlenienie i zwiększoną śmierć komórek. Adipocyty zaczynają wydzielać cytokiny prozapalne, przede wszystkim: czynnik martwicy nowotworów (TNF-α, ang. *Tumor Necrosis Factor* α), interleukiny: IL-6, IL-8 oraz MCP-1 (białko chemotaktyczne monocytów) [16,22].

3.2. Adipokiny

W okresie obejmującym lata 50.-70. XX w., w badaniach prowadzonych w modelach zwierzęcych wykazano na istnienie czynników regulujących masę ciała występujących w krążeniu – adipokin. Odnotowano normalizację masy ciała otyłych gryzoni, po wprowadzeniu do ich krwiobiegu krwi pobranej od gryzoni szczupłych [24-26]. Odkrycia te rozpoczęły nowy kierunek badań związanych z patofizjologią otyłości.

Pełen garnitur ludzkich adipokin nadal nie jest w dokładnie scharakteryzowany, jednak wskazuje się na obecność 600 potencjalnych białek wydzielanych przez tkankę tłuszczową. Adipokiny wytwarzane przez AT są substancjami biologicznie aktywnymi, działającymi jak hormony. Komórkowe białka sygnalizacyjne regulują różne procesy biologiczne w narządach docelowych, w tym w mięśniach, sercu, mózgu, trzustce, wątrobie i układzie odpornościowym [17].

Adipokiny przyczyniają się do regulacji apetytu i sytości, dystrybucji tłuszczu, wydatku energetycznego, nasilenia stanu zapalnego oraz homeostazy węglowodanowej poprzez kontrolę wydzielania insuliny i wrażliwości tkanek na ten hormon [21]. U osób z prawidłowym stanem metabolicznym istnieje równowaga pro- i przeciwzapalnych adipokin [17]. W otyłości, wzrost WAT prowadzi do zmian w profilu adipokin – zwiększa się stężenie adipokin prozapalnych (leptyna, rezystyna) oraz obniża się stężenie adipokin przeciwzapalnych (adiponektyna) [19]. Trzewna akumulacja tkanki tłuszczowej związana jest z przerostem adipocytów, które rekrutują naciekające komórki odpornościowe. Uwalniane są adipokiny, które prowadzą do rozwoju ogólnoustrojowego stanu zapalnego o niskim nasileniu (LGI, ang. *Low Grade Inflamination)* oraz szeregu konsekwencji metabolicznych, w tym przede wszystkim insulinooporności.

Zwiększone zużycie energii, np. poprzez zastosowanie ćwiczeń fizycznych, będzie stymulowało termogenezę i poprzez poprawę metabolizmu węglowodanów związaną ze zwiększoną utylizacją glukozy przez tkanki insulinowrażliwe, będzie wywoływać obniżenie LGI [20]. Wydzielanie leptyny zmienia się w dysfunkcji tkanki tłuszczowej i może przyczyniać się do rozwoju chorób związanych z otyłością [21]. To dwustronne połączenie leptyna – AT pozwala na projektowanie szeregu możliwości terapeutycznych.

3.2.1. Leptyna i możliwości terapeutyczne

Leptyna, jedna z najbardziej znanych adipokin prozapalnych to hormon peptydowy, zawierający 167 reszt aminokwasów, wytwarzany głównie przez WAT [27]. Mniejsze ilości leptyny wykryto także w BAT, łożysku, żołądku, mięśniach, szpiku kostnym, zębach i mózgu. Leptyna krąży we krwi w postaci wolnej (forma aktywna biologicznie), jak i związanej z białkami osocza. Równowaga między wolną i związaną leptyną reguluje jej biodostępność [28]. Leptyna bierze udział w kontroli apetytu, uczucia sytości, przyjmowania pokarmu, wydatku energetycznym, funkcjach rozrodczych oraz płodności [27]. Jej stężenie we krwi jest wprost proporcjonalne do masy tkanki tłuszczowej i odzwierciedla stan metaboliczny organizmu – zwiększa się u pacjentów z otyłością oraz po spożyciu pokarmu i zmniejsza przy utracie wagi oraz podczas postu [29]. Mechanizm ten jest związany z adaptacyjną odpowiedzią fizjologiczną na stan głodu [28]. Wydzielanie leptyny jest stymulowane poprzez insulinę, kortykosteroidy oraz TNF-α, a hamowane pod wpływem katecholamin oraz hormonów tarczycy [28].

Hiperleptynemia wywołana otyłością stymuluje produkcję cytokin prozapalnych: TNF-α, IL-6, IL-2, IL-1β oraz hamuje uwalnianie cytokiny przeciwzapalnej (IL-4)

oraz adiponektyny [17,20]. Leptyna stymuluje wydzielanie TNF-α, a z drugiej strony ekspozycja na TNF-α zwiększa ekspresję leptyny w tkance tłuszczowej. Taki mechanizm tworzy pętlę sprzężenia zwrotnego promującą stan zapalny, który u większości pacjentów otyłych przyjmuje formę LGI [28].

Pionierskie badania nad leptyną dotyczyły jej roli w regulacji homeostazy energetycznej i otyłości, a punkty uchwytu tego białka wskazywano na poziomie centralnego układu nerwowego. Zauważono, że u osób z niedoborem leptyny w dzieciństwie rozwija się otyłość. Pacjentów tych leczono substytucyjnie leptyną, która hamowała nadmierny apetyt i zwiększała wydatek energetyczny. Obecnie wiadomo, że większość otyłych pacjentów charakteryzuje się jednak podwyższonym stężeniem krążącej we krwi leptyny w porównaniu z osobami o prawidłowej masie ciała [30]. Wskazuje się, że u tych osób występować mogą mechanizmy związane z opornością na ten hormon [31]. Jednak dokładne poznanie tych mechanizmów wciąż pozostaje niezbadane. Wskazuje się między innymi na upośledzenie transportu leptyny przez barierę krew mózg [32]. W związku z tym, terapie farmakologiczne otyłości z zastosowaniem leptyny wymagają prowadzenia dalszych badań.

Tabela 1. Czynniki warunkujące zmiany stężenia leptyny

Bodziec	Kierunek zmian stężenia leptyny
Operacja bariatryczna [33]	↓
20 zabiegów krioterapii ogólnoustrojowej BMI >30 [34]	↓
20 zabiegów krioterapii ogólnoustrojowej BMI <24,9 [34]	→
20 zimowych kąpieli wodnych BMI prawidłowe [35]	↑
Dieta ketogeniczna [36]	↓
Zmodyfikowana dieta śródziemnomorska [37]	↓
Dieta bogata w błonnik [38]	↓
Dieta wysokobiałkowa i niskoglikemiczna [39]	↓
Stosowanie oleju z czarnuszki (*Nigella sativa* L.) [40]	↓
Trening aerobowy [41, 42]	↓
Trening oporowy [43]	→

Źródło: opracowanie własne; ↓ spadek stężenia; ↑ wzrost stężenia; → brak zmian; BMI (ang. *Body Mass Index*) [kg/m^2]

W pracy Wilhelm i wsp. (2021) porównano wyniki badań biochemicznych krwi 98 pacjentów – w tym wyniki 47 osób oczekujących na operację bariatryczną (wiek 45,04 ± 10,67 lat; BMI 46,92 ±7,42 kg/m^2) z wynikami 51 osób po operacji bariatrycznej (wiek 41,67 ±11,27 lat; BMI 32,21 ±4,43 kg/m^2). Stwierdzono istotnie wyższe stężenia leptyny u skrajnie otyłych pacjentów przed operacją bariatryczną i wskazano na znaczące obniżenie stężenia tego białka w surowicy po operacji bariatrycznej ($p < 0,001$).

Wzrost masy tkanki tłuszczowej prowadzi do znacznej indukcji leptyny, a jej ekspresja zmniejsza się podczas utraty masy ciała [33].

Najskuteczniejszą aktywację BAT u ludzi uzyskuje się termogenezą wywołaną zimnem [44]. Leitner i wsp. (2019) wskazali, że aktywność BAT zbliża się do szczytowej funkcji tuż po rozpoczęciu chłodzenia. Po usunięciu ekspozycji na zimno aktywna objętość BAT spada, jednak proces dezaktywacji utrzymuje się nawet do kilku godzin. Kinetyka ludzkiego BAT charakteryzuje się zatem szybkim wzrostem w odpowiedzi na bodziec kriogeniczny, ale stopniowym spadkiem po ponowny ogrzaniu organizmu [45]. Na tej podstawie wskazuje się, że krótkotrwała ekspozycja na zimno, jaką jest krioterapia ogólnoustrojowa, może być stosowana w celu aktywacji BAT i leczenia otyłości oraz chorób współistniejących.

Leptyna, odgrywająca kluczową rolę w kontroli homeostazy energetycznej, działa poprzez wiązanie z receptorami LepR (receptor dla leptyny), występującymi głównie w podwzgórzu. Białko to stymuluje termogenezę BAT poprzez aktywację ośrodkowych LepR działających głównie poprzez sympatyczny układ nerwowy [44]. Obniżenie stężenie leptyny podczas serii zabiegów krioterapii ogólnoustrojowej, na co wskazują poniższe prace, może zatem być ściśle powiązane z aktywacją BAT.

Pilch i wsp. (2022) odnotowali znaczny spadek stężenia leptyny oraz TNF-α po serii 20 zabiegów krioterapii ogólnoustrojowej (WBC, ang. *Whole Body Cyrotherapy*) u mężczyzn z różnymi stopniami otyłości (grupa o BMI 30-34,9 kg/m^2 oraz grupa o BMI > 35 kg/m^2). W grupie kontrolnej, o prawidłowej masie ciała (BMI < 24,9) nie wskazano różnic w stężeniu leptyny po serii zabiegów WBC [34]. Ptaszek i wsp. (2023) analizowali zmiany stężeń wybranych adipokin, w tym także leptyny, pod wpływem 20 zabiegów WBC oraz 20 zimowych kąpieli wodnych (tzw. morsowanie). W badaniu tym uczestniczyła także grupa kontrolna, która nie była poddana żadnym zabiegom. Każda z grup składała się z 30 osób (15 mężczyzn i 15 kobiet). Wskazano na wzrost stężenia leptyny u kobiet i mężczyzn uprawiających zimowe pływanie oraz tendencję wzrostową u kobiet poddanych zabiegom WBC. Jedynie u mężczyzn po serii WBC odnotowano znamienny spadek stężenia leptyny [35]. Zaznaczyć jednak należy, że w badaniach tych wzięły udział osoby o BMI uznawanym za wartość prawidłową. Natomiast w projekcie Pilch i wsp. (2022) grupy eksperymentalne stanowiły osoby otyłe, których wyjściowe wartości stężenia leptyny wykraczały poza zakres referencyjny. Może to oznaczać, że pozytywne działanie kriostymulacji będzie zauważalne jedynie u osób z zaburzeniami funkcjonowania tkanki tłuszczowej lub że zmiana stężenia leptyny wywołana przez bodziec termiczny będzie inna u osób z prawidłową jej aktywnością oraz u osób z leptynoopornością. Tezę tę podkreślają kolejne badania, gdzie obniżenie stężenia leptyny wskazano po zastosowaniu 10 zabiegów WBC wykonywanych z częstotliwością raz/dwa razy w tygodniu u osób z cukrzycą typu II lub zespołem metabolicznym, których BMI wahało się w granicach 26,5-30,2 kg/m^2 i odpowiadało osobom z nadwagą i otyłością [46].

Poza bodźcowaniem organizmu niskimi temperaturami, badano także inne możliwości wpływu na skład ciała, a przez to modyfikowanie stężenia leptyny we krwi. Jako terapie uzupełniające, pomagające regulować czynniki zapalne, zaleca się niektóre składniki diety oraz ekstrakty ziołowe [47]. Obecnie wiadomo już, że zastosowanie diety ketogenicznej [36], zmodyfikowanej diety śródziemnomorskiej [37], diety bogatej w błonnik [38] oraz wysokobiałkowej i niskoglikemicznej [39] może znacząco obniżyć stężenie leptyny. Codzienna suplementacja olejem z czarnuszki (*Nigella sativa* L.) powoduje

obniżenie stężenia cytokin prozapalnych związanych z otyłością (IL-1, IL-1β) oraz leptyny [40]. Lederer i wsp. (2022) wskazali na reakcję leptyny zależną od płci przy zmianie diety. W wyniku przejścia mężczyzn stosujących wcześniej dietę mieszaną (fleksitarianizm) na dietę bogatą w mięso po 4 tygodniach stwierdzono istotny wzrost stężenia leptyny. U kobiet nie odnotowano podobnych zależności [41]. Należy jednak zauważyć, że zmiana diety dotyczyła mężczyzn zdrowych o prawidłowym BMI. U wolontariuszy, prócz różnic w stężeniu leptyny, nie odnotowano żadnych niepożądanych aberracji w wynikach testów laboratoryjnych. Nie jest zatem jasne, czy wzrost stężenia leptyny w tym przypadku prowadził do patologicznie zwiększonego stanu zapalnego [41]. Brak negatywnego wpływu mimo wzrostu leptyny może także wynikać z krótkiego czasu prowadzenia obserwacji, co jednak wymagałoby potwierdzenia w kolejnych badaniach o przedłużonym protokole badawczym. Na uwagę zasługuje jednak obserwowana różnica reakcji na zmianę diety zależna od płci. Do podobnych wniosków doszli Kempf i wsp. (2022), którzy również potwierdzili, że stężenie leptyny w surowicy krwi koreluje z płcią [39].

Ośmiotygodniowy trening aerobowy o wysokiej intensywności połączony z dietą wysokobiałkową obniżył stężenie leptyny u chłopców z otyłością (wiek 5-12 lat; BMI pomiędzy 85. a 99. percentylem dla danej grupy wiekowej) [41]. Badania Li i wsp. (2022) wskazują, że już sam 16-tygodniowy trening aerobowy (4 dni w tygodniu po 60 min) wpłynął na znaczące obniżenie stężenia leptyny w surowicy krwi u otyłych, nastoletnich dziewczynek [42]. Praca Rezaeeshirazi (2022) wskazuje jednak, że nie każdy rodzaj treningu będzie tak efektywny jak trening aerobowy. W randomizowanych badaniach z udziałem otyłych mężczyzn wskazano, że trening aerobowy w porównaniu z oporowym może być użyteczną formą treningową u osób z grupy ryzyka rozwoju chorób metabolicznych, w tym poprzez obniżenie stężenia leptyny [43]. Wyniki badań na ten temat nie są jednak spójne. Valinejad i Khodaei (2022) odnotowali spadek stężenia leptyny zarówno w grupie z treningiem aerobowym, jak i oporowym. Uczestnicy badań mieli jednak dodatkowo stosowaną dietę ketogeniczną, a w grupie kontrolnej, która utrzymywała wyłącznie dietę ketogeniczną, również nastąpił spadek stężenia leptyny. Nie można zatem jednoznacznie stwierdzić, czy przy zastosowaniu samego treningu oporowego, bez diety ketogenicznej, wyniki byłyby podobne [48]. Pozytywny wpływ odpowiedniej diety i ćwiczeń fizycznych na stężenie leptyny potwierdzili także Salas-Salvadó i wsp. (2019) oraz Cipryan i wsp. (2021) [49,50].

Leptyna działa jako cytokina immunomodulująca, regulująca reakcje zapalne i funkcje odpornościowe [29]. Zdolność do magazynowania energii (regulowana przez sprzężenie zwrotne między tkanką tłuszczową a mózgiem), koordynowana przez leptynę, jest powiązana ze zdolnością tej adipokiny do aktywowania/wygaszania pewnych reakcji fizjologicznych na podstawie dostępności energii. Jedną z tych reakcji jest zdolność do aktywacji układu odpornościowego w celu zwalczania infekcji [51]. Receptor leptyny ulega ekspresji w całym układzie odpornościowym, a regulacyjne działanie leptyny obejmuje układ odporności wrodzonej i nabytej [52]. Przewlekłe LGI i podwyższone stężenie leptyny w otyłości zaburzają funkcje układu odpornościowego, zwiększając tym samym ryzyko ciężkiego przebiegu różnych chorób zakaźnych, co obserwowano chociażby na przykładzie choroby COVID-19 [51, 53].

Dodatkowo leptyna wykazuje działanie angiogenne i aterogenne, co wskazuje na jej potencjalny wpływ na rozwój chorób współistniejących w otyłości – cukrzycy typu II oraz chorób układu krążenia [17]. Obniżenie stężenia leptyny może być zatem również obiecującą strategią zapobiegania chorobom cywilizacyjnym współistniejącym z otyłością.

4. Wnioski

Adipokiny stają się obiecującym celem terapeutycznym u osób z otyłością. Leptyna, prozapalna adipokina, odgrywa ważną rolę w otyłości oraz w patogenezie zaburzeń metabolicznych związanych z tą jednostką chorobową. W oparciu o dostępne dowody naukowe można stwierdzić, że istotne obniżenie stężenia leptyny jest możliwe do uzyskania poprzez zastosowanie odpowiedniej diety, treningów aerobowych oraz zabiegów kriostymulacji ogólnoustrojowej. Pojawiają się dowody na korzystny efekt łączenia kilku bodźców, których celem ma być obniżenie stężenia leptyny (przede wszystkim połączenie treningu i diety). Na efektywność tych niefarmakologicznych metod obniżania stężenia leptyny wpływ może mieć płeć otyłego pacjenta. Modulacja stężenia leptyny tymi metodami może być stosowana jako główna lub wspomagająca terapia leczenia otyłości, zwłaszcza u osób, u których ze względów zdrowotnych nie można zastosować leczenia farmakologicznego.

Literatura

1. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight [data dostępu: 18.07.2024].
2. Agurto H.S., Alcantara-Diaz A.L., Espinet-Coll E., Toro-Huamanchumo C.J., *Eating Habits, Lifestyle Behaviors and Stress during the COVID-19 Pandemic Quarantine among Peruvian Adults*, PeerJ, 11(9), 2021, s. e11431.
3. Alharbi H.F., Barakat H., *Effect of COVID-19 Pandemic on Dietary Habits and Sleep Quality Applying the Pittsburgh Sleep Quality Index in Adult Saudi Population: A Cross-Sectional Study*, International Journal of Environmental Research and Public Health, 19(19), 2022, s. 11925.
4. Camacho S., Ruppel A., *Is the Calorie Concept a Real Solution to the Obesity Epidemic?*, Global Health Action, 10(1), 2017, s. 1289650.
5. Mayoral L.P., Andrade G.M., Mayoral E.P., Huerta T.H., Canseco S.P., Rodal Canales F.J., Cabrera-Fuentes H.A., Cruz M.M., Pérez Santiago A.D., Alpuche J.J., Zenteno E., Ruíz H.M., Cruz R.M., Jeronimo J.H., Perez-Campos E., *Obesity Subtypes, Related Biomarkers & Heterogeneity*, Indian Journal of Medical Research, 151(1), 2020, s. 11-21.
6. Piché M.E., Tchernof A., Després J.P., *Obesity Phenotypes, Diabetes, and Cardiovascular Diseases*, Circcularlion Research, 126, 2020, s. 1477-1500.
7. Polyzos S.A., Kountouras J., Mantzoros C.S., *Obesity and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: from Pathophysiology to Therapeutics*, Metabolism, 92, 2019, s. 82-97.
8. Almendros I., Martinez-Garcia M.A., Farré R., Gozal D., *Obesity, Sleep Apnea, and Cancer*, International Journal of Obesity, 44(8), 2020, s. 1653-1667.
9. Kumthekar A, Ogdie A., *Obesity and Psoriatic Arthritis: A Narrative Review*, Rheumatology and Therapy, 7(3), 2020, s. 447-456.
10. Silvestris E., de Pergola G., Rosania R., Loverro G., *Obesity as Disruptor of the Female Fertility*, Reproductive Biology and Endocrinology, 16(1), 2018, s. 22.
11. Avgerinos K.I., Spyrou N., Mantzoros C.S., Dalamaga M., *Obesity and Cancer Risk: Emerging Biological Mechanisms and Perspectives*, Metabolism, 92, 2019, s. 121-135.
12. Elagizi A., Kachur S., Carbone S., Lavie C.J., Blair S.N., *A Review of Obesity, Physical Activity, and Cardiovascular Disease*, Current Obesity Reports, 9, 2020, s. 571-581.
13. Sakers A., De Siqueira M.K., Seale P., Villanueva C.J., *Adipose-Tissue Plasticity in Health and Disease*, Cell, 185, 2022, s. 419-446.
14. Zorena K., Jachimowicz-Duda O., Ślęzak D., Robakowska M., Mrugacz M., *Adipokines and Obesity. Potential Link to Metabolic Disorders and Chronic Complications*, International Journal of Molecular Sciences, 21, 2020, s. 3570.

15. Frigolet M.E., Gutiérrez-Aguilar R., *The Colors of Adipose Tissue*, Gaceta Medica de Mexico, 156(2), 2020, s. 142-149.
16. Koenen M., Hill M.A., Cohen P., Sowers J.R., *Obesity, Adipose Tissue and Vascular Dysfunction*, Circulation Research, 128, 2021, s. 951-968.
17. Kirichenko T.V., Markina Y.V., Bogatyreva A.I., Tolstik T.V., Varaeva Y.R., Starodubova A.V., *The Role of Adipokines in Inflammatory Mechanisms of Obesity*, International Journal of Molecular Sciences, 23, 2022, s. 14982.
18. Liu L., Shi Z., Ji X., Zhang W., Luan J., Zahr T., Qiang L., *Adipokines, Adiposity, and Atherosclerosis*, Cellular and Molecular Life Sciences, 79(5), 2022, s. 272.
19. Ren Y., Zhao H., Yin C., Lan X., Wu L., Du X., Griffiths H.R., Gao D., *Adipokines, Hepatokines and Myokines: Focus on Their Role and Molecular Mechanisms in Adipose Tissue Inflammation*, Frontiers in Endocrinology, 13, 2022, s. 873699.
20. Kirk B., Feehan J., Lombardi G., Duque G., *Muscle, Bone, and Fat Crosstalk: the Biological Role of Myokines, Osteokines, and Adipokines*, Current Osteoporosis Reports, 18, 2020, s. 388-400.
21. Fasshauer M., Blüher M., *Adipokines in Health and Disease*, Trends in Pharmacological Sciences, 36, 2015, s. 461-470.
22. Taylor EB., *The Complex role of Adipokines in Obesity, Inflammation, and Autoimmunity*, Clinical Science, 135, 2021, s. 731-752.
23. Becher T., Palanisamy S., Kramer D.J., Eljalby M., Marx S.J., Wibmer A.G., Butler S.D., Jiang C.S., Vaughan R., Schoder H., Mark A., Cohen P., *Brown Adipose Tissue is Associated with Cardiometabolic Health*, Nature Medicine, 27(1), 2021, s. 58-65.
24. Coleman L., *Effects of Parabiosis of Obese with Diabetes and Normal Mice*, Diabetologia, 9(4), 1973, s. 294-298.
25. Hervey G.R., *The Effects og Lesions in the Hypothalamus in Parabiotic Rats*, The Journal of Physiology,145(2), I959, s. 336-352.
26. Parameswaran S.V., Steffens A.B., Hervey G.R., Ruiter D.E., *Involvement of a humoral factor in regulation of body weight in parabiotic rats*, American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiolog, 232(5), 1977, s. 150-157.
27. Chung H.S., Choi K.M., *Organokines in disease. In: Advances in Clinical Chemistry*, Academic Press Inc, 2020, s. 261-321.
28. Obradovic M., Sudar-Milovanovic E., Soskic S., Essack M., Arya S., Stewart A.J., Gojobori T., Isenovic E.R., *Leptin and Obesity: Role and Clinical Implication*, Frontiers in Endocrinology, 12, 2021, s. 585887.
29. Ren Y., Zhao H., Yin C., Lan X., Wu L., Du X., Friffiths H.R., Gao D., *Adipokines, Hepatokines and Myokines: Focus on Their Role and Molecular Mechanisms in Adipose Tissue Inflammation*, Frontiers in Endocrinology, 13, 2022, s. 873699.
30. Perakakis N., Farr O.M., Mantzoros C.S., *Leptin in Leanness and Obesity: JACC State-of-the-Art Review*, Journal of the American College of Cardiology, 77, 2021, s. 745-760.
31. Cui H., López M., Rahmouni K., *The Cellular and Molecular Bases of Leptin And Ghrelin Resistance in Obesity*, Nature Reviews. Endocrinology, 13(6), 2017, s. 338-351.
32. Izquierdo A.G., Crujeiras A.B., Casanueva F.F., Carreira M.C., *Leptin, Obesity, and Leptin Resistance: Where Are We 25 Years Later?*, Nutrients, 11, 2019, s. 2704.
33. Wilhelm J., Birkenstock A., Buchholz V., Müller A., Aly S.A., Gruner-Labitzke K., Koehler H., Lichtinghagen R., Jahn K., Groh A., Kahl K.G., de Zwaan M., Hillemacher T., Bleich S., Frieling H., *Promoter Methylation of LEP and LEPR before and after Bariatric Surgery: A Cross-Sectional Study*, Obesity Facts, 14(1), 2021, s. 93-99.
34. Pilch W., Piotrowska A., Wyrostek J., Czerwińska-Ledwig O., Ziemann E., Antosiewicz J., Zasada M., Kulesa-Mrowiecka M., Żychowska M., *Different Changes in Adipokines, Lipid Profile, and TNF-Alpha Levels between 10 and 20 Whole Body Cryostimulation Sessions in Individuals with I and II Degrees of Obesity*, Biomedicines, 10(2), 2022, s. 269.

35. Ptaszek B., Podsiadło S., Wójcik A., Czerwińska-Ledwig O., Teległów A., *The Influence of Whole-Body Cryotherapy or Winter Swimming on the Lipid Profile and Selected Adipokines*, BMC Sports Science, Medicine and Rehabilitation, 15(1), 2023, s. 135.
36. Brenton J.N., Lehner-Gulotta D., Woolbright E., Banwell B., Bergqvist A.G.C., Chen S., Coleman R., Conaway M., Goldman M.D., *Phase II Study of Ketogenic Diets in Relapsing Multiple Sclerosis: Safety, Tolerability and Potential Clinical Benefits*, Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry, 93(6), 2022, s. 637-644.
37. Gioxari A., Grammatikopoulou M.G., Katsarou C., Panagiotakos D.B., Toutouza M., Kavouras S.A., Sidossis L.S., Maraki M.I., *A Modified Mediterranean Diet Improves Fasting and Postprandial Glucoregulation in Adults with Overweight and Obesity: A Pilot Study*, International Journal of Environmental Research and Public Health, 19(22), 2022, s. 15347.
38. Triffoni-Melo A. de T., de Castro M., Jordão A.A., Leandro-Merhi V.A., Dick-De-Paula I., Diez-Garcia R.W., *High-fiber diet promotes metabolic, hormonal, and satiety effects in obese women on a short-term caloric restriction*, Arquivos de Gastroenterologia, 60(2), 2023, s. 163-171.
39. Kempf K., Röhling M., Banzer W., Braumann K.M., Halle M., Schaller N., McCarthy D., Predel H.G., Schenkenberger I., Tan S., Toplak H., Martin S., Berg A., *Early and Strong Leptin Reduction Is Predictive for Long-Term Weight Loss during High-Protein, Low-Glycaemic Meal Replacement—A Subanalysis of the Randomised-Controlled ACOORH Trial*, Nutrients, 14(12), 2022, s. 2537.
40. Razmpoosh E., Safi S., Mazaheri M., Khalesi S., Nazari M., Mirmiran P., Nadjarzadeh A., *A Crossover Randomized Controlled Trial Examining the Effects of Black Seed (Nigella sativa) Supplementation on IL-1β, IL-6 and Leptin, and Insulin Parameters in Overweight and Obese Women*, BMC Complementary Medicine and Therapies, 24(1), 2024, s. 22.
41. Lederer A.K., Storz M.A., Huber R., Hannibal L., Neumann E., *Plasma Leptin and Adiponectin after a 4-Week Vegan Diet: A Randomized-Controlled Pilot Trial in Healthy Participants*, International Journal of Environmental Research and Public Health, 19(18), 2022, s. 1137.
42. Li C., Lyu S., Zhang J., *Effects of Aerobic Exercise on the Serum Leptin Level and Heart Rate Variability in the Obese Girl Children*, Computational Intelligence and Neuroscience, 2022, s. 2298994.
43. Rezaeeshirazi R., *Aerobic Versus Resistance Training: Leptin and Metabolic Parameters Improvement in Type 2 Diabetes Obese Men*, Research Quaterly Exercise and Sport, 93(3), 2022, s. 537-547.
44. Seoane-Collazo P., Martínez-Sánchez N., Milbank E., Contreras C., *Incendiary Leptin*, Nutrients, 12, 2020, s. 472.
45. Leitner B.P., Weiner L.S., Desir M., Kahn P.A., Selen D.J., Tsang C., Kolodny G.M., Cypess A.M., *Kinetics of Human Brown Adipose Tissue Activation and Deactivation*, International Journal of Obesity, 43(3), 2019, s. 633-637.
46. Lushchyk M., Danilova L., Tuzava H., Dudzik N., Zhauneryk S., *Whole Body Cryotherapy Effect on Weight Gain and Metabolic Parameters of Metabolic and Type 2 Diabetic Patients*, Endocrine Abstracts, 63, 2019, s. 930.
47. Teng L., Lee E.L., Zhang L., Barnes J., *Herbal Preparations for Weight Loss in Adults*, Cochrane Database of Systematic Reviews, 4, 2020, s. CD013576.
48. Valinejad A., Khodaei K., *Does Exercise During a Ketogenic Diet Effectively Alter Appetite Sensation, Appetite-Regulating Hormones, and Body Composition?*, Experimental Biology and Medine, 247(21), 2022, s. 1898-1906.
49. Salas-Salvadó J., Díaz-López A., Ruiz-Canela M., Basora J., Fitó M., Corella D., Serra-Majem L., Wärnberg J., Romaguera D., Estruch R., Vidal J., Martínez J.A., Arós F., Vázquez C., Ros E., Vioque J., López-Miranda J., Bueno-Cavanillas A., Tur J.A.,

Tinahones F.J., Martín V., Lapetra J., Pintó X., Daimiel L., Delgado-Rodríguez M., Matía P., Gómez-Gracia E., Díez-Espino J., Babio N., Castañer O., Sorlí J.V., Fiol M., Zulet M.Á., Bulló M., Goday A., Martínez-González M.Á., *Effect of a Lifestyle Intervention Program with Energy-Restricted Mediterranean Diet and Exercise on Weight Loss and Cardiovascular Risk Factors: One-Year Results of the PREDIMED-Plus Trial*, Diabetes Care, 42(5), 2019, s. 777-788.

50. Cipryan L., Dostal T., Plews D.J., Hofmann P., Laursen P.B., *Adiponectin/Leptin Ratio Increases after A 12-Week Very Low-Carbohydrate, High-Fat Diet, and Exercise Training in Healthy Individuals: A Non-Randomized, Parallel Design Study*, Nutrition Research, 87, 2021, s. 22-30.
51. Guglielmi V., Colangeli L., D'adamo M., Sbraccia P., *Susceptibility and Severity of Viral Infections in Obesity: Lessons From Influenza To Covid-19. Does Leptin Play a Role?*, International Journal of Molecular Sciences, 22, 2021, s. 1-20.
52. Pérez-Pérez A., Vilariño-García T., Fernández-Riejos P., Martín-González J., Segura-Egea J.J., Sánchez-Margalet V., *Role of Leptin As a Link Between Metabolism and the Immune System*, Cytokine and Growth Factor Reviews, 35, 2017, s. 71-84.
53. Muskiet F.A.J., Carrera-Bastos P., Pruimboom L., Lucia A., Furman D., *Obesity and Leptin Resistance in the Regulation of the Type I Interferon Early Response and the Increased Risk for Severe COVID-19*, Nutrients, 14(7), 2022, s. 1388.

Leptyna w otyłości – możliwości terapeutyczne

Streszczenie

Otyłość to globalny problem będący uznanym czynnikiem występowania szeregu chorób cywilizacyjnych i, w konsekwencji: przedwczesnej śmierci. W patogenezie oraz przebiegu tej choroby obserwuje się zaburzenia związane z wytwarzaniem oraz aktywnością adipokin. Jest to zróżnicowana grupa związków wytwarzanych przez komórki tkanki tłuszczowej o szerokim wpływie tak na tkanki lokalne, jak i cały organizm. Wpływają na kolejne etapy procesów metabolicznych, modulując jednocześnie nasilenie stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego, rozwój otyłości i innych chorób współistniejących. W niniejszym przeglądzie opisano funkcje jednej z najwcześniej poznanych, prozapalnych adipokin – leptyny. Podkreślono jej rolę w badaniach dotyczących patogenezy otyłości i jej powikłań, w regulacji apetytu i uczucia sytości, a przez to w ilości przyjmowania pokarmu. Opisano także szereg form niwelowania jej patologicznie wysokiego stężenia, w tym zastosowanie diety ketogenicznej oraz bodźców fizykalnych, w tym krioterapii ogólnoustrojowej. Opisano znaczenie aktywności fizycznej oraz metod łączonych w postaci interwencji dietetyczno-treningowych. Obiecujące wyniki notuje się dla zastosowania ćwiczeń aerobowych o wysokiej intensywności. Leptyna wciąż pozostaje ważnym markerem oraz celem terapeutycznym dla skutecznych interwencji związanych z leczeniem otyłości.
Słowa kluczowe: otyłość, adipokiny, leptyna

Leptin in Obesity – Therapeutic Options

Abstract

Obesity is a global problem that is a recognized factor in a number of diseases of civilization and, consequently: premature death. In the pathogenesis and course of this disease, disorders related to the production and activity of adipokines are observed. This is a diverse group of compounds produced by adipose tissue cells with a wide impact on both local tissues and the whole body. They influence the subsequent stages of metabolic processes while modulating the severity of inflammation and oxidative stress, the development of obesity and other comorbidities. This review describes the functions of one of the earliest known pro-inflammatory adipokines - leptin. Its role in studies of the pathogenesis of obesity and its complications, in the regulation of appetite and satiety sensation, and thus in the amount of food intake, is highlighted. Also described are a number of forms of leveling its pathologically high concentration, including the use of ketogenic diets and physical stimuli, including systemic cryotherapy. The importance of physical activity and combined methods in the form of dietary and training interventions are described. Promising results are noted for the use of high-intensity aerobic exercise. Leptin still remains an important marker and therapeutic target for effective interventions related to the treatment of obesity.
Keywords: obesity, adipokines, leptin

Publikacja nr 4 ***Use of Measurement Probes to Evaluate the Effect of a Series of Whole-Body Cryostimulation Treatments on Skin Characteristics in Subjects with Different BMIs***

applied sciences

MDPI

Article

Use of Measurement Probes to Evaluate the Effect of a Series of Whole-Body Cryostimulation Treatments on Skin Characteristics in Subjects with Different BMIs

Adrianna Dzidek [1,2,*], Olga Czerwińska-Ledwig [2], Agata Szlachetka [3], Ewa Ziemann [4], Dorota Kasprzak [5], Mariusz Zasada [6] and Anna Piotrowska [2,*]

[1] Doctoral School of Physical Culture Science, University of Physical Culture, 31-571 Krakow, Poland
[2] Institute for Basic Sciences, Faculty of Physiotherapy, University of Physical Culture, 31-571 Krakow, Poland; olga.czerwinska@awf.krakow.pl
[3] Faculty of Medicine and Health Sciences, University of Applied Sciences in Tarnow, 33-100 Tarnow, Poland; a_szlachetka@anstar.edu.pl
[4] Department of Athletics, Strength and Conditioning, Poznan University of Physical Education, 61-871 Poznan, Poland; ziemann@awf.poznan.pl
[5] Department of Beauty Sciences, Faculty of Health Sciences, Vincent Pol University, 20-853 Lublin, Poland; d.kasprzak@pol.edu.pl
[6] Department of Biological Foundations of Physical Culture, Kazimierz Wielki University, 85-064 Bydgoszcz, Poland; mariusz.zasada@ukw.edu.pl
* Correspondence: adrianna.dzidek@doctoral.awf.krakow.pl (A.D.); anna.piotrowska@awf.krakow.pl (A.P.)

Abstract: Whole-body cryotherapy (WBC) is a widely used method that exposes the body to extremely low temperatures to induce physiological responses. While its analgesic, anti-inflammatory, and anti-edema effects are well-documented, the effects of WBC on the skin are not yet fully understood. The aim of this study was to evaluate the effects of a single session of WBC and a series of 10 and 20 treatments on selected biophysical properties of the skin in normal-weight and overweight or obese subjects. Twenty-three volunteers took part in the study—12 in the study group (SG, BMI > 27) and 11 in the control group (CG, BMI 18–25). Skin hydration, transepidermal water loss (TEWL), pH, and skin elasticity were measured each time before and after the 1st, 10th, and 20th WBC treatments. All assessments were carried out under standard conditions using specialized probes. The skin in response to the cryogenic stimulus differed according to BMI and anatomical location. In SG: skin firmness on the face ($p < 0.001$) and forearm ($p < 0.001$), hydration ($p = 0.004$), and pH ($p = 0.005$) on the forearm significantly improved, while TEWL increased after a series of treatments in both groups ($p = 0.028$). WBC appears to be a safe and effective method of modulating the biophysical properties of the skin, with effects varying by BMI and body region. However, the role of WBCs in exacerbating TEWL should continue to be observed, and in the future, it is also advisable to develop methods to offset this adverse effect.

Keywords: cryotherapy; cryostimulation; corneometry; tewametry; cutometry; biophysical features of the skin; consequences of obesity; safety of treatments

check for updates

Academic Editor: Jongsung Lee

Received: 4 February 2025
Revised: 1 March 2025
Accepted: 4 March 2025
Published: 7 March 2025

Citation: Dzidek, A.; Czerwińska-Ledwig, O.; Szlachetka, A.; Ziemann, E.; Kasprzak, D.; Zasada, M.; Piotrowska, A. Use of Measurement Probes to Evaluate the Effect of a Series of Whole-Body Cryostimulation Treatments on Skin Characteristics in Subjects with Different BMIs. *Appl. Sci.* **2025**, *15*, 2897. https://doi.org/10.3390/app15062897

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Whole-body cryotherapy (WBC) is defined as the technique of extreme cooling of the body (below −100 °C) for a short period (1–3 min) to induce a physiological response to cold [1]. The term cryostimulation refers to the use of cold exposure among healthy subjects

(e.g., athletes); cryotherapy, on the other hand, refers to the use of cold in medical treatment including the management of injuries, inflammation, and other disorders [2].

Cryogenic temperatures have been successfully used in patients with rheumatoid arthritis [3], multiple sclerosis [4], fibromyalgia [5], and more recently, adjunctively in the treatment of obesity [6–8]. The effects of cryotherapy on improving mood and mental state are also indicated [9–11]. Additionally, growing evidence suggests the potential use of low temperatures in dermatology and cosmetology [12–14].

The skin is responsible for many functions including secretory, sensory, and defense [15]. It protects internal organs and tissues, receives signals from the environment, and prevents excessive water loss. In addition to its biological functions, it defines a person's physical appearance, affecting his or her well-being and quality of life [16]. Skin characteristics such as hydration, pH, and TEWL ensure the integrity of the epidermal barrier. TEWL, defined as the amount of condensed water diffusing through a fixed area of the stratum corneum into the air in a given unit of time, is one of the most important parameters characterizing the skin barrier. Increased values may be associated with epidermal barrier dysfunction [17].

In cryotherapy, the skin is directly exposed to low temperatures. A decrease in peripheral temperature, primarily of the skin, triggers basic thermoregulatory responses aimed at maintaining a constant body temperature. There is a constriction of blood vessels in the skin bed, reducing blood flow and consequently minimizing heat transfer between the body's core and outer layers [18,19].

As previous studies have indicated, the effects of low-temperature treatments on the human body are dependent on body composition [8,20]. These reactions are most likely related to the presence of adipose tissue acting as an insulator. On the other hand, however, it has also been pointed out that body composition has a strong influence on skin condition [21]. Individuals with a higher BMI have been reported to have higher tewametric scores, indicating reduced skin barrier capacity [22]. This may be related to the presence of chronic, subclinical inflammation that is part of obesity and metabolic syndrome. Its presence is associated with a higher incidence of certain dermatoses in obese individuals [23].

Single exposures to cold [13] and the use of a series of WBC treatments [24] and their effects on basic skin characteristics have already been the subject of scientific research. However, the number of publications addressing this topic is still small. A 2021 study [13] evaluated the effect of a single 3 min WBC treatment on skin features. A total of 77 young people (age 23.63 $\pm$ 1.36) participated. This study suggests that a single WBC treatment leads to an improvement in skin hydration and a decrease in acid–base reaction, but statistical significance was not reached. However, an unfavorable direction of change was indicated for skin barrier function as assessed by evaluating TEWL (transepidermal water loss), measured in men on the zygomatic bone. The study by Skrzek et al. [24] involved 22 middle-aged women (58.7 $\pm$ 7.54) who underwent 10 WBC treatments. Skin characteristics were measured before and after the first and last treatment. After the first treatment, there was an increase in hydration, which was statistically significant in only one of the eight measured locations on the body. An adverse effect on the hydration level of the stratum corneum was noted for the entire treatment series. Other changes in skin characteristics were not noted, while it was indicated that different parts of the skin react differently to low temperatures.

The aim of the present study was to evaluate the impact of a single cryogenic stimulus and a series of 20 WCB treatments on selected skin characteristics in overweight/obese and normal-weight subjects.

2. Materials and Methods

2.1. Study Group

A group of volunteers was recruited for the study, from which normal-weight and overweight or obese subjects were selected [25]. In each group, medical history was taken, and inclusion and exclusion criteria were applied. Study volunteers were grouped according to the indicated criteria in a study group (SG) with a BMI (body mass index) above 27 and a control group (CG) with a BMI within the normal range (18–25). Participants in the study group (SG), consisting of individuals with increased body fat, were matched to the control group (CG) based on age and gender. Ultimately, 23 subjects completed the project (Figure 1).

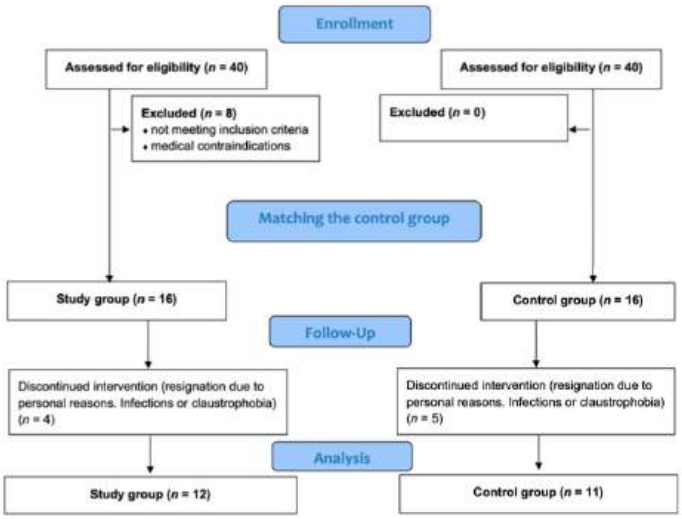


Figure 1. Patient flow chart.

The inclusion criteria considered in the process of qualifying participants for the project were BMI > 27 for the study group; BMI 18.5–25 for the control group; not taking winter baths, and no use of systematic cryotherapy at least 6 months prior; written consent for voluntary participation in the study; and consent of the qualifying physician. The exclusion criteria were chronic endocrine and dermatological diseases; skin conditions of fungal, bacterial, or viral origin; health problems (neurological or orthopedic) that prevent independent movement; taking anti-inflammatory medications and supplements containing vitamins and antioxidants; and lack of consent to participate in the study.

Participants read the study protocol and signed consent forms before starting the study. Participation in the project was completely voluntary. Each volunteer was informed that they could withdraw from the project at any stage, without providing a reason. The study protocol was approved by the Bioethics Committee of the Regional Medical Chamber in Kraków (177/KBL/OIL/2023 dated 25 September 2023). Interventional studies involving animals or humans and other studies that require ethical approval must specify the authority that provided approval and the corresponding ethical approval code.

2.2. Study Protocol

A medical consultation was conducted for each participant prior to the study. The study protocol consisted of a series of 20 sessions of systemic cryotherapy taking place daily (4 weeks excluding Saturdays and Sundays). Participants were allowed to miss one cryotherapy treatment; multiple absences resulted in exclusion from the study. Before each entry into the cryotherapy chamber, blood pressure was measured (blood pressure above 160/100 mmHg prevented participation in the treatment and further participation in the project).

Body composition was assessed before the first treatment in the cryochamber. Selected skin parameters were measured immediately before and after the 1st, 10th, and 20th WBC sessions at two locations: on the face near the zygomatic bone and on the inside of the forearm (Figure 2). It was assumed that the survey would be conducted on the dominant hand. In the room where the biophysical skin features were measured, constant conditions prevailed, as required by the manufacturer of the measurement probes, with humidity of 45% and air temperature of 21 °C monitored during the tests.

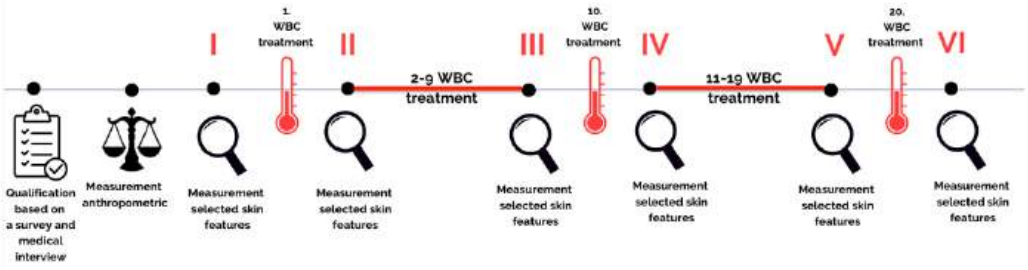


Figure 2. Research flow chart.

2.3. Cyrotherapy

Preparation for the procedure followed standard protocols. Before entering the cryochamber, volunteers were asked to remove jewelry and glasses and to dress in appropriate attire: a cap, a mask covering the nose and mouth, a bathing suit/shorts, gloves, gaiters or long socks covering the tibias and knee joints, and clogs with thick soles. Each WBC procedure included a 30 s acclimatization in the cryochamber atrium (−60 °C), followed by a 3 min treatment in the cryochamber proper (−120 °C). Volunteers walked in a single file, changing direction every 30 s. They exited the cryochamber through its atrium. Immediately after exiting, participants underwent skin characteristics measurements and, in turn, were directed to the training room, where they performed aerobic exercises. Each treatment took place under the supervision of a specialist who monitored its progress through a window built into the cryochamber. Participants were informed that they could leave the cryochamber early if they experienced discomfort.

2.4. Anthropological Measurements

Body height was measured once using a Seca 216 growth meter (Hamburg, Germany), with an accuracy of 5 mm. Body weight was measured with a JAWON MEDICAL IOI-353-CE0197 scale (Jawon Medical Co., Ltd., Gyeongsan, Republic of Korea) using the bioimpedance method. In addition, BMI was calculated for each subject.

2.5. Skin Characteristic Measurements

Skin parameters were measured according to the protocol of the Skin Physiology Laboratory (CLNB) of the AKF in Krakow (Academy of Physical Culture in Krakow, certificate number PN-EN ISO 9001:2015: PW-08606-19). Measurements were performed on healthy, undamaged skin. The Multi Probe Adapter (MPA) System (Courage-Khazaka GmBH, Cologne, Germany) was used. The set included measuring probes from the same manufacturer: (1) Corneometer CM 825 (measurement error: ±3%); (2) Tewameter TM 300 (measurement error: water loss: ±0.5 g/h/m^2 for RH ≥ 30%; ±1.0 g/hm^2 for RH ≤ 30%); (3) Skin-pH-Meter PH 905 (error: ±0.1); and (4) Cutometer Dual MPA 580. Due to the storage of the pH measurement electrode in potassium chloride aqueous solution, the skin pH measurement was made last in the series of measurements so as not to disturb the measurement results of other parameters.

A 1-s measurement method was used for the corneometric and pH-metric measurements and a continuous (20 s) method for the tewametric measurements. The cutometer test included a suction phase (the skin was suctioned with a vacuum for 3 s) and a 3 s relaxation phase. All measurements were taken at a given location three times, and the arithmetic mean of the results was calculated.

2.6. Statistical Analysis

The results were analyzed using JASP 0.16.4 (University of Amsterdam, The Netherlands) and were presented using basic descriptive statistics. The type of distribution of variables was analyzed using the Shapiro–Wilk test. The initial characteristics of the study groups were compared using the Student's *t*-test for independent groups. For variables with a normal distribution and with all other assumptions met, the ANOVA test for repeated measures with post hoc tests (Bonferroni test) was used. The effect size was calculated using the Omega squared coefficient (ω^2) and interpreted as follows: 0.01–small, 0.06–medium, and 0.14–large. Effect size in post hoc tests was measured by Cohen's coefficient (d) and interpreted as follows: 0.2–small, 0.5–medium, and 0.8–large. For variables with a non-normal distribution, the Friedman nonparametric test was used. The presence of correlation was checked using Spearman's test (rho). The significance level (α) was set at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Group and Baseline Skin Characteristics

The study group (SG) consisted of six women and six men. The control group (CG) included eight women and three men. Detailed characteristics of each group are shown in Table 1. Biophysical characteristics of the skin measured before the study are shown in Table 2.

Table 1. Characteristic of the group.

	SG		CG		*p* SG vs. CG
	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	
Age [years]	43.92	13.08	43.55	11.5	0.989
Weight [kg]	92.7	12.96	69.13	10.34	0.006
Height [cm]	171.67	8.34	171.36	8.65	0.839
BMI [kg/m^2]	31.34	2.57	23.47	2.29	<0.001

SG—study group, GC—control group, $\bar{x}$—average, SD—standard deviation, BMI—body mass index.

Table 2. Baseline biophysical features of the participants' skin on the face and forearm.

	Face										
	Study Group					Control Group					p SG vs. CG
	$\bar{x}$	SD	Med	Min	Max	$\bar{x}$	SD	Med	Min	Max	
Hydration [IU]	51.73	13.12	52.30	26.07	72.93	55.77	8.91	55.53	42.47	68.93	0.185
TEWL [g/m^2/h]	20.28	3.42	19.42	15.81	27.12	10.94	3.50	10.50	5.80	16.80	<0.001
pH	4.89	0.55	4.83	4.05	6.02	4.81	0.78	5.00	3.47	5.85	0.715
R^0	0.30	0.06	0.33	0.21	0.38	0.18	0.03	0.18	0.13	0.23	<0.001
R^2	77.04	13.96	77.69	51.63	96.90	65.52	10.52	66.77	53.63	85.93	0.061
	Forearm										
	Study group					Control group					p SG vs. CG
	$\bar{x}$	SD	Med	Min	Max	$\bar{x}$	SD	Med	Min	Max	
Hydration [IU]	40.77	8.84	38.45	30.40	57.53	44.91	6.92	45.90	35.20	55.70	0.074
TEWL [g/m^2/h]	20.74	12.26	15.71	9.54	42.64	12.94	5.79	11.10	7.06	25.90	0.111
pH	4.98	0.74	4.64	4.19	6.66	4.67	0.73	4.67	3.76	5.84	0.273
R^0	0.29	0.04	0.29	0.22	0.35	0.19	0.02	0.19	0.17	0.22	<0.001
R^2	79.86	6.77	81.30	69.33	90.17	75.76	6.97	77.37	64.47	83.67	0.369

SG—study group, GC—control group, $\bar{x}$—average, SD—standard deviation, BMI—body mass index, TEWL—transepidermal water loss, R^0—skin firmness, R^2—skin elasticity

3.2. Study of the Impact of Single Exposure WBC

Initially, the effect of a single cold exposure on the measured skin characteristics was assessed. The effect of the 1st, 10th, and 20th treatments was checked. Different changes were indicated for SG and CG. In the normo-weight group, a significant increase was indicated in forearm hydration after the 1st treatment ($p = 0.020$; d = −0.835) and an increase in the R^2 cutometer parameter on the forearm at the 20th treatment ($p = 0.025$; d = −0.796). In overweight or obese subjects: there was a significant decrease in TEWL on the forearm at the 10th treatment ($p = 0.045$; d = 0.652) and 20th treatment ($p = 0.030$; d = 0.721). There were no differences among the study groups after a single application of the cryogenic stimulus in the form of WBC for biophysical characteristics of facial skin (Table 3).

Table 3. Studying of the effect of single exposure on a cold exposure.

		SG			CG		
		I vs. II	**III vs. IV**	**V vs. VI**	**I vs. II**	**III vs. IV**	**V vs. VI**
Hydration [IU]	Face	0.080	0.089	0.167	0.511	0.103	0.561
	Forearm	0.332	0.850	0.117	0.020 *	0.328	0.156
TEWL [g/m^2/h]	Face	0.482	0.141	0.089	0.291	0.061	0.082
	Forearm	0.710	0.045 *	0.030 *	0.341	0.290	0.128
pH	Face	0.595	0.594	0.339	0.093	0.231	0.445
	Forearm	0.818	0.562	0.215	0.274	0.341	0.220

Table 3. *Cont.*

		SG			CG		
		I vs. II	III vs. IV	V vs. VI	I vs. II	III vs. IV	V vs. VI
R^0	Face	0.381	0.072	0.468	0.424	0.422	0.260
	Forearm	0.452	0.422	0.921	0.701	0.091	0.109
R^2	Face	0.243	0.802	0.352	0.095	0.562	0.493
	Forearm	0.381	0.588	0.054	0.399	0.062	0.025 *

SG—study group, GC—control group, SD—standard deviation, BMI—body mass index, TEWL—transepidermal water loss, R^0—skin firmness, R^2—skin elasticity, * $p < 0.05$. I—measurement before 1st cryotherapy; II—measurement after 1st cryotherapy; III—measurement before 10th cryotherapy; IV—measurement after 10th cryotherapy; V—measurement before 20th cryotherapy; VI—measurement after 10th cryotherapy

3.3. Study of the Impact of Multiple Exposures WBC

The next step investigated whether there was an adaptation of the skin to the cryogenic stimulus over time. A comparison of differences in measurements of skin biophysical characteristics before and after WBC treatment for the 1st, 10th, and 20th treatments was performed (Table 4). A difference was indicated for the effect on the tewametric score for the SG forearm ($p = 0046$; $\omega^2 = 0.135$). Further analysis of the results indicated a difference between the effect produced by the 10th and 20th treatments ($p = 0.023$; d = −1.023). The CG indicated a difference in skin firmness R^0 ($p = 0.009$; $\omega^2 = 0.205$). A difference is noted between the effect induced by the 10th and 20th treatments ($p = 0.032$; d = 1.183), and between the effect induced by the 1st and 10th there was a difference at the level of statistical trend ($p = 0.063$; d = −1.152)

Table 4. Studying the effect of adaptation on the effect of a single cold exposure.

		SG							CG						
		Δ1		Δ10		Δ20			Δ1		Δ10		Δ20		
		$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	p	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	p
Hydration [IU]	Face	7.13	7.03	9.69	10.88	7.77	7.19	0.623	7.99	8.09	6.23	6.19	6.54	7.79	0.873
	Forearm	7.58	7.76	6.11	5.46	12.49	8.76	0.078	4.26	3.13	8.93	8.74	6.47	8.22	0.275
TEWL [g/m²/h]	Face	5.08	3.6	2.59	1.96	10.25	15.06	0.172	3.20	2.70	9.24	7.94	6.78	7.70	0.105
	Forearm	16.96	20.33	3.41	5.48	17.99	12.87	0.046 *	4.77	4.15	17.73	14.97	11.91	15.91	0.144
pH	Face	0.74	0.74	0.52	0.46	0.71	0.4	0.614	0.7	0.48	0.47	0.29	0.54	0.57	0.484
	Forearm	0.74	0.81	0.63	0.70	0.8	0.75	0.857	0.69	0.6	0.34	0.29	0.45	0.43	0.212
R^0	Face	0.30	0.88	0.04	0.05	0.05	0.09	0.913	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.01	0.337
	Forearm	0.03	0.03	0.30	0.86	0.02	0.02	0.094	0.02	0.02	0.04	0.03	0.02	0.01	0.009 *
R^2	Face	15.16	15.92	7.81	4.38	14.35	18.76	0.779	3.81	2.69	4.54	3.08	3.58	3.72	0.463
	Forearm	7.54	5.58	8.20	5.04	11.13	8.54	0.401	4.32	3.45	11.02	9.71	5.58	5.42	0.529

SG—study group, GC—control group, $\bar{x}$—average, SD—standard deviation, BMI—body mass index, TEWL—transepidermal water loss, R^0—skin firmness, R^2—skin elasticity, * $p < 0.05$

3.4. Study of Impact of Series of WBC on Selected Skin Characteristics

To illustrate the effect of a series of treatments of WBC on selected skin characteristics, the results performed before the 1st (I), before the 10th (III), and before the 20th treatment (V) were compared among themselves.

The results of skin hydration measurements on the face and forearms are shown in Figure 3. Analysis of the results of the corneometric measurements on the face indicated significant differences in measurements only for the interaction measurement x group ($p = 0.028$; $\omega^2 = 0.055$).

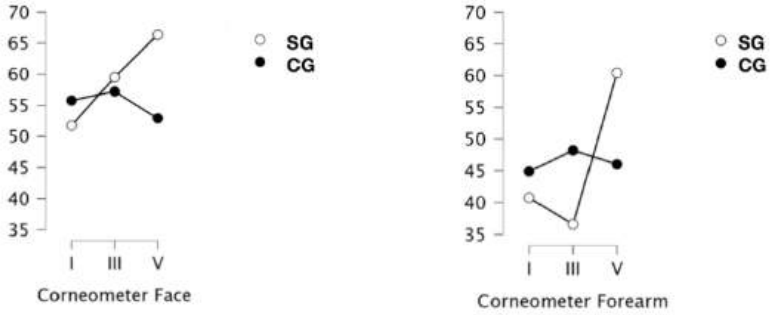


Figure 3. Measurement of hydration [IU] of the skin of the face and forearms in a group of obese or overweight (SG) and normo-weight (CG) subjects taken before the project (I), after a series of 9 treatments (III) and 19 treatments (V) WBC.

For the forearm, significant differences in the results were indicated ($p = 0.002$; $\omega^2 = 0.116$). An interaction of score x group was noted ($p < 0.001$; $\omega^2 = 0.139$). Subsequent tests indicated that the results after a series of 4 weeks of treatments were significantly different from baseline ($p = 0.012$; d = −0.793) and also those after 2 weeks ($p = 0.022$; d = −0.826). When the type of group was included in the analysis, it was indicated that only the results obtained in the SG group were responsible for these differences. Thus, the results after the full 4-week series in the obese and overweight group were significantly different from the baseline results of this group ($p = 0.004$; d = −1500) and the results after the 9-treatment series ($p = 0.002$; d = −1820). In contrast, there were no differences between skin hydration at baseline and after 9 treatments.

The results of the tewametric measurements showing the magnitude of TEWL are shown in Figure 4. Significant differences were indicated for measurements on the face ($p = 0.002$; $\omega^2 = 0.124$), and a measurement x group interaction was also indicated ($p < 0.001$; $\omega^2 = 0.287$). Assessing the significance of the effect of the number of treatments on the state of the skin barrier assessed tewametrically, only a trend for the significance of difference I vs III was indicated. However, the results after 19 treatments were significantly different from the baseline ($p = 0.003$; d = −0.970). At the same time, the skin condition after 9 and 19 treatments did not differ. When group type was added to the analysis, it was indicated that baseline SC and CG scores differed significantly ($p < 0.001$; d = 1.665). In the obese and overweight group, significant differences were indicated after 9, when the lowest scores were observed, and after 19 treatments, where the highest TEWL values were indicated. For normal-weight subjects, baseline results differed from those determined after 9 treatments ($p < 0.001$; d = −2.064) and after 19 treatments ($p = 0.003$; d = −1.640). Both series lengths induced a significant increase in TEWL in this group.

Tewameter results on the skin of the forearms were significantly different ($p = 0.006$; $\omega^2 = 0.132$), and a measurement x group interaction was indicated ($p < 0.001$; $\omega^2 = 0.225$). It was indicated that the results after the 19th treatment were significantly higher than baseline ($p = 0.028$; d = −0.849) and those determined after nine treatments ($p = 0.022$; d = −0.928). Taking the group additionally into account, it was indicated that the baseline scores of participants in the two groups did not differ. The study group indicated significantly higher results after the full 4-week series of treatments compared to those obtained after 2 weeks ($p < 0.001$; d = −2.154).

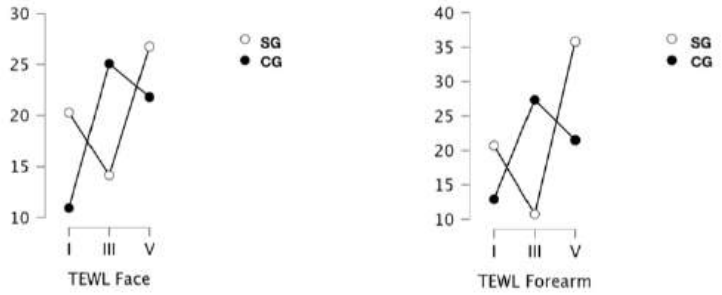


Figure 4. Measurement of transepidermal water loss (TEWL) [$g/m^2/g$] the skin of the face and forearms in a group of obese or overweight (SG) and normo-weight (CG) subjects taken before the project (I), after a series of 9 treatments (III) and 19 treatments (V) WBC.

The results of skin acid–base (pH) measurements are shown in Figure 5. Significant differences were indicated for measurements collected on facial skin only for the outcome x group interaction ($p < 0.001$; $\omega^2 = 0.196$). Post hoc tests indicated significantly higher indications for SG after 9 treatments ($p = 0.042$; d = −1.325) with a return decrease after another 2 weeks (III vs. V: $p = 0.001$; d = 1.709). It was also indicated that the SG group responded differently to a series of nine treatments, and in Measure III, SG results were significantly different from CG ($p = 0.003$; d = 1.831).

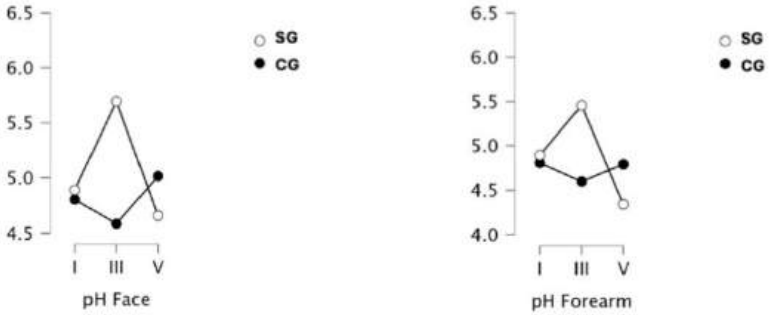


Figure 5. Measurement of acid–base reaction (pH) of the skin of the face and forearms in a group of obese or overweight (SG) and normo-weight (CG) subjects taken before the project (I), after a series of 9 treatments (III) and 19 treatments (V) WBC.

As with skin pH on the face, on the forearm significant differences occurred only for the outcome × group interaction ($p = 0.007$; $\omega^2 = 0.133$). The directions of change for both groups closely resembled what was observed on facial skin. pH in the SG increased significantly in Measure III (difference vs. CG $p = 0.011$; d = 1.354) and decreased in Measure V (difference vs. III $p = 0.005$; d = 1.757).

Cutometric assessment of skin firmness is possible by monitoring the R^0 index. Its changes in SG and CG are shown in Figure 6. Significant differences in this index assessed on the face were indicated ($p = 0.001$; $\omega^2 = 0.137$), and interaction with the group was also indicated ($p = 0.006$; $\omega^2 = 0.096$). Significantly lower scores were observed for measurement V compared to baseline (I) measurement ($p < 0.001$; d = 0.995), and significant differences between the SG and CG were also indicated ($p < 0.001$; d = 1.865). A closer analysis including these two factors (measurement and group) indicated significant differences between SG and CG in all measurements: baseline difference ($p < 0.001$; d = 2.611); after nine treatments ($p = 0.005$; d = 2.061) except the last one. Results after 20 treatments were

similar in both groups. Something that was not observed for participants with normal BMI values was significant decreases in R^0 after 19 treatments ($p < 0.001$; d = 1.839) compared to baseline. This decrease ultimately allowed, after a 4-week series of treatments, for results similar to those observed in the control group throughout the project.

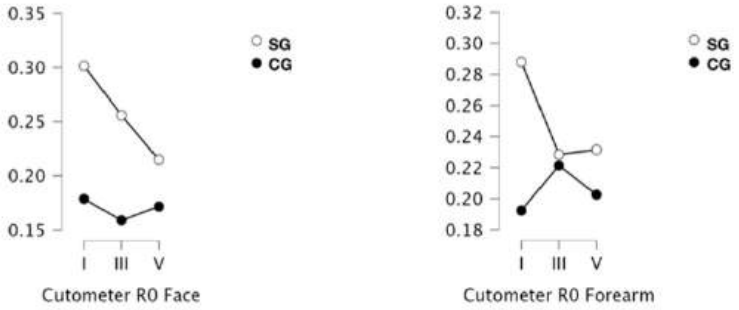


Figure 6. Measurement of cutometric measurement (firmness assessment, R^0) of the skin of the face and forearms in a group of obese or overweight (SG) and normo-weight (CG) subjects taken before the project (I), after a series of 9 treatments (III) and 19 treatments (V) WBC.

For skin on the forearms, significant differences were indicated only after accounting for the group (interaction: $p = 0.004$; $\omega^2 = 0.160$). The variable itself was also a differentiating factor: group ($p < 0.001$; $\omega^2 = 0.268$). In the group with higher BMI values, significantly higher scores were observed in Measure I compared to CG ($p < 0.001$; d = 2.324). In the overweight and obese group, a significant decrease in R^0 was observed after 19 runs ($p < 0.001$; d = 1.374), after 9 runs the decrease was within the statistical trend ($p = 0.072$; d = 1.448).

The results of cutometric measurements, this time showing visco-elasticity of the skin (R2), are shown in Figure 7. The results for the face and forearm did not differ between the groups at any of the measurement points.

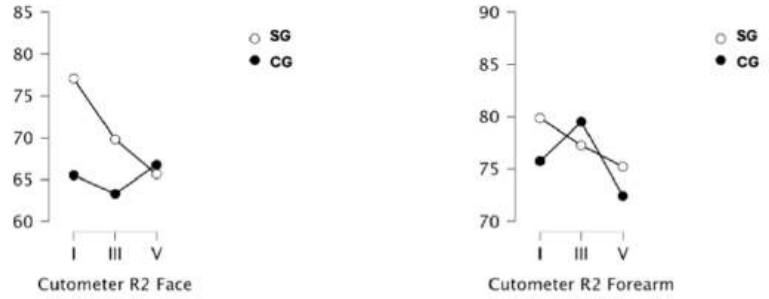


Figure 7. Measurement of cutometric measurement (visco-elasticity evaluation, R2) of the skin of the face and forearms in a group of obese or overweight (SG) and normo-weight (CG) subjects taken before the project (I), after a series of 9 treatments (III) and 19 treatments (V) WBC.

3.5. Correlations

The results of the correlation analysis are shown in Table 5. The results of skin parameters measured on the forearm correlated with those assessed on the face for hydration ($p < 0.001$; Spearman's rho = 0.749), TEWL ($p = 0.031$; Spearman's rho = 0.453), pH ($p < 0.001$; Spearman's rho = 0.868) and the R^0 parameter (<0.001; Spearman's rho = 0.893). Also indicated was the presence of a correlation between the R^0 value and hydration

($p = 0.022$; Spearman's rho = −0.474) of the skin on the forearm. A correlation was noted between TEWL and R^0 on the forearm (0.054; Spearman's rho = 0.409) and facial TEWL with: R^0 ($p < 0.001$; Spearman's rho = 0.653); R^2 ($p = 0.017$; Spearman's rho = 0.492) and BMI ($p < 0.001$; Spearman's rho = 0.758). A correlation with the R^0 parameter was also indicated for BMI, both for the face ($p > 0.001$; Spearman's rho = 0.675) and forearm ($p < 0.001$; Spearman's rho = 0.714).

Table 5. Spearman's Correlations.

		Spearman's rho	*p*
Hydration face	Hydration forearm	0.749	<0.001 *
TEWL face	TEWL forearm	0.453	0.031 *
pH Face	pH forearm	0.868	<0.001 *
R^0 face	R^0 forearm	0.793	<0.001 *
Hydration forearm	R^0 forearm	−0.474	0.022 *
TEWL forearm	R^0 forearm	0.409	0.054
TEWL face	R^0 face	0.653	<0.001 *
TEWL face	R^2 face	0.492	0.017 *
TEWL face	BMI	0.758	<0.001 *
R^0 face	BMI	0.675	<0.001 *
R^0 forearm	BMI	0.714	<0.001 *

TEWL—transepidermal water loss, R^0—skin firmness, R2—skin elasticity, BMI—body mass index, * $p < 0.05$

4. Discussion

The literature highlights the significance of cryotherapy in cosmetology, emphasizing the strong effect of cryogenic temperatures on the condition of human skin [12,26]. In the present study, skin elasticity and stratum corneum hydration in the SG significantly improved after a series of WBC treatments. The effect of cryogenic temperatures on the skin is multidirectional. It is known that WBC has an inhibitory effect on the amount of ROS and stimulates antioxidant production [27,28]. However, other mechanisms regarding the effect on the skin are not yet fully understood. It has been suggested that stimulation of circulation will increase the supply of oxygen to the cells and nutrients, which consequently improves the appearance of the skin [1,29]. The present results primarily indicate that the effect of cryochamber treatments on the skin is dependent on BMI, with those with elevated values of this index responding with positive changes in a number of the biophysical measurements used in this project.

In the present project, it was chosen to evaluate skin features on only one limb. The literature data indicate that skin features may differ between the dominant and non-dominant hand. Higher TEWL was indicated on the dominant hand in the study of Treffel et al., [30], while Enright and Nikolis [31], in skin topography imaging, indicated higher SEW values associated with winkles depth on the dominant hand. This indicates that the dominant hand may be more prone to skin aging. Although other studies have not confirmed a relationship between skin features and the dominant and non-dominant hand [32,33], randomizing the choice of limb seemed an inappropriate choice.

The values of stratum corneum hydration, pH and skin elasticity differed significantly depending on the site of measurement. Obese subjects showed higher hydration and firmness values and lower pH values on the face. In normal-weight subjects, significantly higher pH values were recorded on the face. Piotrowska et al. [13] and Skrzek et al. [24] also reported higher hydration values on the face compared to the extremities. However,

the pH results in the analyzed studies were inconsistent. Piotrowska et al. [13] reported higher pH on facial skin, while Skrzek et al. [24] noted no pH differences in the measured areas. The directions of changes in the results of pH measurements obtained in the present study are inconclusive, but it is worth mentioning that in all the mentioned studies, pH values were within the range of physiological values.

Previous studies have shown that skin on different areas of the body responds differently to WBC. Consistent with previous observations, also in the present study, the skin on the forearm responded more strongly to the cryogenic stimulus than the skin on the face [13,24,34].

A cross-sectional study [35] found that obesity affects the degree of hydration of the stratum corneum on the forearm. In the present study, no differences were found in baseline hydration parameters between the groups, nor was there a relationship between BMI and the degree of hydration. After the 19th treatment, however, SG skin had higher values of hydration of the stratum corneum than before the treatment series, with no differences noted in CG.

An improvement in hydration was observed after the first treatment on forearm skin in CG, and the noted increase reached statistical significance. An improvement in hydration was also indicated in an earlier study [13], but statistical significance was not achieved. In that study [13], the skin of the volunteers was in the range corresponding to dry, while in the present study, the skin of the volunteers was determined to be properly moisturized, which may affect the final outcome of the study and suggest that for dry skin, the cryogenic stimulus alone will not be sufficient.

The only adverse change noted in both groups during the treatment series was increased TEWL, which may be due to an increased vascular reflex in response to cold. Piotrowska et al. [13] also reported an increase in TEWL after a single WBC treatment. SG was initially characterized by higher TEWL values than CG, which is consistent with previous observations [36,37]. Guida et. et al. [38] reported significantly lower TEWL values in obese subjects compared to the normal-weight group, but no correlation between TEWL and BMI was indicated. In the present study, such a correlation was noted, as was Yew et al. [22]. The authors noted that as BMI increased by 1 km/m^2, TEWL increased (0.221%). Obese patients have larger skin folds and thicker layers of subcutaneous fat. For proper thermoregulation, this group, compared to normal fat subjects, will sweat more, hence water evaporation from the skin surface will be higher [39].

The normal pH of the skin is in the range of 4.1–4.8, which ensures the integrity and integrity of the stratum corneum and the regulation of epidermal barrier homeostasis [40]. Acidic skin pH also protects the commensal skin microflora, which acts as the first line of defense against pathogens [41]. As a result of a number of factors (e.g., diabetes, skin aging, and skin diseases), microbial dysbiosis can occur, increasing the risk of infection [42]. Ma et al. [36] did not indicate changes in the skin microbiota among individuals with varying degrees of body fatness. The present study did not indicate differences in baseline pH measurements between the groups, which is consistent with the results of Yew et al. [43], who also showed no differences in pH measurements in subjects with normal and high BMI. However, the study by Ibuki et al. [44] indicated that skin pH was slightly higher in the group with higher BMI. Initially, the pH in the SG increased significantly, reaching values on the borderline of physiological skin pH, with a subsequent significant decrease. CG reacted inversely to the treatments, but pH values were within the range of physiological values throughout. In other work on cryotherapy [24,45], the pH values also remained in a constant acidic environment, but in contrast, no significant differences were noted during the treatment series. Therefore, it can be concluded that cryotherapy does not negatively affect the pH of the skin, and thus it can be assumed that it does not have a negative effect

on the skin's microbiome and hydrolipid barrier controlled by its well-being. However, confirmation of this hypothesis requires further research.

Measurement of pH is assessed by the presence of water present on the skin surface. The highest pH values were indicated in the most hydrated areas [46]. Increased TEWL would therefore indicate higher pH values. It is worth noting that an inverse relationship was noted in the study participants. As TEWL increased, pH values decreased, and vice versa. Both characteristics are key indicators of proper hydrolipid barrier function. It is possible that the skin, in response to increased water loss, triggers defensive reactions to maintain the integrity of the epidermal barrier, thus decreasing the pH value.

The SG group was characterized by higher R^0 values in the cutometric measurement, indicating lower skin firmness than observed in subjects with normal BMI values. It is worth noting that the average age of the two groups was similar to each other, and therefore the influence of age on this skin parameter can be excluded. The influence of obesity on the rate of aging of the body including the skin has been increasingly noted in the literature [47–49]. Liu et al. [47] pointed to strong correlations between obesity and facial skin aging. In a study on an animal model [50], it was observed that the collagen content of the skin was similar in a group of obese and lean mice, but the surface area of the obese skin was 60% larger which translates into a weaker mechanical strength of this tissue.

The skin of the obese subjects in the present study responded differently to the cryogenic stimulus than the skin of subjects with normal BMI values. Before the 10th treatment, the SG's skin on the forearm had lower corneometric values than baseline and higher tewametric values, followed by an increase in these values. The forearm skin of normal-weight subjects reacted inversely. There was an initial increase in these values and a decrease between the 10th and 20th treatments. The pH value initially increased in the SG, with a subsequent decrease in values. Again, the CG's skin reacted inversely.

Walker et al. [51] noted no differences in epidermal thickness among obese (BMI 35–50) and normal-weight (BMI 18–27) subjects. The present study did not examine epidermal thickness. There is an important element that is worth considering in future studies using high-frequency ultrasound imaging.

Obesity causes structural and functional changes in microvessels, including endothelial dysfunction. However, studies of obese individuals have noted significant alterations in the expression of genes encoding proteins that alter skin oxygenation and may contribute to poorer wound and ulcer healing [51]. Control of vascular tone and secretion of paracrine factors is impaired, affecting organ function and contributing to an altered release of adipokines and inflammatory cytokines [52]. As mentioned earlier, cryotherapy results in enhanced microvascular reflex. Systemic microvascular dysfunction in obese individuals may therefore also affect the skin and the effectiveness of treatments. Accordingly, it can be concluded that the skin of obese people, with a baseline higher degree of vascular dysfunction, responds more strongly to the cryogenic stimulus.

Individuals exposed to a series of repeated, intermittent periods of cold exposure should exhibit a number of physiological adaptations that alter the strength and quality of the body's response to the initial episodes of cold exposure [19]. The present study, however, indicates that the vast majority of skin parameters studied do not show adaptations to the cryogenic stimulus, and each treatment, regardless of whether it is the first or last in a series, produces an identical effect. Adaptation differences were observed for TEWL on facial skin in the group of subjects with higher BMI (the last treatment induced a stronger effect than the first treatment). Similarly, different responses to the first and last treatments in the series were observed in skin hydration and for the R^0 parameter in SG. In each case, these changes were on the skin on the forearms, which, as described earlier, responds more strongly than the skin on the face.

The present study confirms the positive effects of 20 WBC treatments on the skin, particularly in obese individuals. Other works have also indicated the positive effects of WBC treatments in obese individuals on weight and fat loss [6,53,54], improvement of lipid profile [55], and anti-inflammatory effects of this form of physical treatment [6,20,56]. Thus, cryogenic treatments should be considered as a safe form of health support for people struggling with overweight and obesity.

Study Limitations

Study participants were matched in terms of study group characteristics, but the groups were small in size. Further studies conducted with a larger number of volunteers would provide a more complete picture of the effects of a series of systemic cryotherapy treatments on skin conditions.

5. Conclusions

Whole-body cryotherapy appears to be a safe treatment for the skin. Baseline measurements of skin characteristics, including TEWL and skin firmness, showed variability among study groups. Positive effects of cryotherapy among obese subjects were indicated for forearm skin hydration and pH, and skin firmness in both locations. The upper extremities appear to be more sensitive to cold exposure than the facial region. The effect of the cryogenic stimulus will depend on the number of treatments, BMI, and the anatomical location of the assessed skin areas.

Author Contributions: Conceptualization, A.P. and A.D.; methodology, A.D., A.P., E.Z., M.Z. and A.S.; software, O.C.-L. and A.D.; validation, A.D., A.P. and O.C.-L.; formal analysis, A.D. and A.P.; investigation, A.D.; resources, A.D., O.C.-L.; A.S., E.Z., D.K., M.Z. and A.P.; data curation, A.D., A.S. and D.K.; writing—original draft preparation, A.D. and A.P.; writing—review and editing, A.D. and O.C.-L.; A.S., E.Z., D.K., M.Z. and A.P.; visualization, A.D., O.C.-L., A.S., E.Z., D.K., M.Z. and A.P.; supervision, A.D., A.P., E.Z. and M.Z.; project administration, A.D.; funding acquisition, A.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Academy of Physical Culture in Krakow, grant numbers 165/MN/INP/2023 and 317/BS/INP/2023. The acquisition of the measurement apparatus utilized in this project was facilitated by funds secured through a grant from the Ministry of Science and Higher Education (Poland) under the designation "Regional Initiative for Perfection" for the years 2019–2022, project number 022/RID/2018/19.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the principles outlined in the 7th revision of the Declaration of Helsinki and received approval from the bioethical committee of the Regional Medical Chamber in Krakow (no: 177/KBL/OIL/2023, dated 25 September 2023).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author due to the bioethics committee decision.

Acknowledgments: The authors would like to express their sincere thanks to Wanda Pilch for her support and mentoring.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Sieron, A.; Cieslar, G.; Stanek, A. *Cryotherapy: Theoretical Bases, Biological Effects, Clinical*; α-Medica Press: Bielsko-Biała, Poland, 2010.
2. Legrand, F.D.; Dugué, B.; Costello, J.; Bleakley, C.; Miller, E.; Broatch, J.R.; Polidori, G.; Lubkowska, A.; Louis, J.; Lombardi, G.; et al. Evaluating Safety Risks of Whole-Body Cryotherapy/Cryostimulation (WBC): A Scoping Review from an International Consortium. *Eur. J. Med. Res.* **2023**, *28*, 387. [CrossRef] [PubMed]
3. Sadura-Sieklucka, T.; Sołtysiuk, B.; Karlicka, A.; Sokołłowska, B.; Kontny, E.; Ksiezopolska-Orłłowska, K. Effects of Whole Body Cryotherapy in Patients with Rheumatoid Arthritis Considering Immune Parameters. *Reumatologia* **2019**, *57*, 320–325. [CrossRef] [PubMed]
4. Dziedzic, A.; Maciak, K.; Miller, E.D.; Starosta, M.; Saluk, J. Targeting Vascular Impairment, Neuroinflammation, and Oxidative Stress Dynamics with Whole-Body Cryotherapy in Multiple Sclerosis Treatment. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 3858. [CrossRef] [PubMed]
5. Klemm, P.; Becker, J.; Aykara, I.; Asendorf, T.; Dischereit, G.; Neumann, E.; Müller-Ladner, U.; Lange, U. Serial Whole-Body Cryotherapy in Fibromyalgia Is Effective and Alters Cytokine Profiles. *Adv. Rheumatol.* **2021**, *61*, 3. [CrossRef]
6. Wiecek, M.; Szymura, J.; Sproull, J.; Szygula, Z. Whole-Body Cryotherapy Is an Effective Method of Reducing Abdominal Obesity in Menopausal Women with Metabolic Syndrome. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 2797. [CrossRef]
7. Rymaszewska, J.E.; Stańczykiewicz, B.; Lion, K.; Misiak, B. The Impact of Whole-Body Cryotherapy on Lipid Profile: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Complement. Ther. Med.* **2020**, *55*, 102568. [CrossRef]
8. Fontana, J.M.; Bozgeyik, S.; Gobbi, M.; Piterà, P.; Giusti, E.M.; Dugué, B.; Lombardi, G.; Capodaglio, P. Whole-Body Cryostimulation in Obesity. A Scoping Review. *J. Therm. Biol.* **2022**, *106*, 103250. [CrossRef]
9. Bouzigon, R.; Grappe, F.; Ravier, G.; Dugue, B. Whole-and Partial-Body Cryostimulation/Cryotherapy: Current Technologies and Practical Applications. *J. Therm. Biol.* **2016**, *61*, 67–81. [CrossRef]
10. Schaal, K.; Le Meur, Y.; Louis, J.; Filliard, J.R.; Hellard, P.; Casazza, G.; Hausswirth, C. Whole-Body Cryostimulation Limits Overreaching in Elite Synchronized Swimmers. *Med. Sci. Sports Exerc.* **2015**, *47*, 1416–1425. [CrossRef]
11. Rymaszewska, J.; Ramsey, D. Whole Body Cryotherapy as a Novel Adjuvant Therapy for Depression and Anxiety. *Arch. Psychiatry Psychother.* **2008**, *2*, 49–57.
12. Dzidek, A.; Piotrowska, A. The Use of Cryotherapy in Cosmetology and the Influence of Cryogenic Temperatures on Selected Skin Parameters—A Review of the Literature. *Cosmetics* **2022**, *9*, 100. [CrossRef]
13. Piotrowska, A.; Aszklar, K.; Dzidek, A.; Ptaszek, B.; Czerwińska-Ledwig, O.; Pilch, W. The Impact of a Single Whole Body Cryostimulation Treatment on Selected Skin Properties of Healthy Young Subjects. *Cryobiology* **2021**, *100*, 96–100. [CrossRef] [PubMed]
14. Rho, N.K. Revisiting the Role of Local Cryotherapy for Acne Treatment: A Review and Update. *J. Clin. Med.* **2023**, *12*, 26. [CrossRef] [PubMed]
15. Sybilski, A. Skin—The Most Important Organ of Our Body. Let's Take Care of It! *Pediatr. Med. Rodz.* **2012**, *8*, 375–379.
16. Harris-Tryon, T.; Grice, E. Microbiota and Maintenance of Skin Barrier Function. *Science* **2022**, *376*, 940–945. [CrossRef]
17. Alexander, H.; Brown, S.; Danby, S.; Flohr, C. Research Techniques Made Simple: Transepidermal Water Loss Measurement as a Research Tool. *J. Investig. Dermatol.* **2018**, *138*, 2295–2300.e1. [CrossRef]
18. Lubkowska, A. Therapeutic Application of Cryotherapy in Chronic Diseases-Clinical Practice. *Fam. Med. Prim. Care Rev.* **2013**, *15*, 233–239.
19. Castellani, J.W.; Young, A.J. Human Physiological Responses to Cold Exposure: Acute Responses and Acclimatization to Prolonged Exposure. *Auton. Neurosci.* **2016**, *196*, 63–74. [CrossRef]
20. Pilch, W.; Piotrowska, A.; Wyrostek, J.; Czerwińska-Ledwig, O.; Ziemann, E.; Antosiewicz, J.; Zasada, M.; Kulesa-Mrowiecka, M.; Żychowska, M. Different Changes in Adipokines, Lipid Profile, and TNF-Alpha Levels between 10 and 20 Whole Body Cryostimulation Sessions in Individuals with I and II Degrees of Obesity. *Biomedicines* **2022**, *10*, 269. [CrossRef]
21. Hirt, P.A.; Castillo, D.E.; Yosipovitch, G.; Keri, J.E. Skin Changes in the Obese Patient. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2019**, *81*, 1037–1057. [CrossRef]
22. Yew, Y.W.; Mina, T.; Ng, H.K.; Lam, B.C.C.; Riboli, E.; Lee, E.S.; Lee, J.; Ngeow, J.; Elliott, P.; Thng, S.T.G.; et al. Investigating Causal Relationships between Obesity and Skin Barrier Function in a Multi-Ethnic Asian General Population Cohort. *Int. J. Obes.* **2023**, *47*, 963–969. [CrossRef] [PubMed]
23. Guo, Z.; Yang, Y.; Liao, Y.; Shi, Y.; Zhang, L. Emerging Roles of Adipose Tissue in the Pathogenesis of Psoriasis and Atopic Dermatitis in Obesity. *JID Innov.* **2022**, *2*, 100064. [CrossRef]
24. Skrzek, A.; Ciszek, A.; Nowicka, D.; Dębiec-Bąk, A. Evaluation of Changes in Selected Skin Parameters under the Influence of Extremely Low Temperature. *Cryobiology* **2019**, *86*, 19–24. [CrossRef]
25. Weir, C.; Jan, A. *BMI Classificatioon Percentile and Cut Off Points*; StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA, 2023.

26. O'Connor, M.; Wang, J.V.; Saedi, N. Whole-and Partial-Body Cryotherapy in Aesthetic Dermatology: Evaluating a Trendy Treatment. *J. Cosmet. Dermatol.* **2019**, *18*, 1435–1437. [CrossRef]
27. Wojciak, G.; Szymura, J.; Szygula, Z.; Gradek, J.; Wiecek, M. The Effect of Repeated Whole-Body Cryotherapy on SIRT1 and SIRT3 Concentrations and Oxidative Status in Older and Young Men Performing Different Levels of Physical Activity. *Antioxidants* **2021**, *10*, 37. [CrossRef] [PubMed]
28. Miller, E.; Mrowicka, M.; Malinowska, K.; Mrowicki, J.; Saluk-Juszczak, J.; Kędziora, J. Effects of Whole-Body Cryotherapy on a Total Antioxidative Status and Activities of Antioxidative Enzymes in Blood of Depressive Multiple Sclerosis Patients. *World J. Biol. Psychiatry* **2011**, *12*, 223–227. [CrossRef]
29. Herrera, E.; Sandoval, M.C.; Camargo, D.M.; Salvini, T.F. Motor and Sensory Nerve Conduction Are Affected Differently by Ice Pack, Ice Massage, and Cold Water Immersion. *Phys. Ther.* **2010**, *90*, 581–591. [CrossRef]
30. Treffel, P.; Panisset, F.; Faivre, B.; Agache, P. Hydration, transepidermal water loss, pH and skin surface parameters: Correlations and variations between dominant and non-dominant forearms. *Br. J. Dermatol.* **1994**, *130*, 325–328. [CrossRef] [PubMed]
31. Enright, K.M.; Nikolis, A. In vivo determination of the skin surface topography and biophysical properties of human hands: Effects of sex and hand dominance. *Ski. Res. Technol.* **2020**, *26*, 277–283. [CrossRef]
32. Piotrowska, A.; Czerwińska-Ledwig, O.; Kotarba, P. Selected hand skin characteristics of laboratory diagnosticians. *Med. Pr. Work. Health Saf.* **2020**, *71*, 725–734. [CrossRef]
33. Szymoniak-Lipska, M.; Dańczak-Pazdrowska, A.; Lipski, A.; Korecka, K.; Żaba, R.; Polańska, A. Transepidermal water loss (TEWL) and transonychial water loss (TOWL) measurements in healthy nail apparatus. *Ski. Res. Technol.* **2024**, *30*, e13851. [CrossRef]
34. Cholewka, A.; Stanek, A.; Sieroń, A.; Drzazga, Z. Thermography Study of Skin Response Due to Whole-Body Cryotherapy. *Ski. Res. Technol.* **2012**, *18*, 180–187. [CrossRef]
35. de Farias Pires, T.; Azambuja, A.P.; Vançan Russo Horimoto, A.R.; Nakamura, M.S.; de Oliveira Alvim, R.; Krieger, J.E.; Pereira, A.C. A Population-Based Study of the Stratum Corneum Moisture. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* **2016**, *9*, 79–87. [CrossRef] [PubMed]
36. Ma, L.; Zhang, H.; Jia, Q.; Bai, T.; Yang, S.; Wang, M.; Li, Y.; Shao, L. Facial Physiological Characteristics and Skin Microbiomes Changes Are Associated with Body Mass Index (BMI). *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* **2024**, *17*, 513–528. [CrossRef]
37. Yang, B.; Lai, Q.; Chen, A.; Ye, L.; Wang, X.; Lai, Y.; Liu, D.; Man, M.Q. Body Mass Index z Scores Correlate with Epidermal Function in Chinese Children. *Diabetes Metab. Syndr. Obes.* **2023**, *16*, 3393–3401. [CrossRef]
38. Guida, B.; Nino, M.; Perrino, N.R.; Laccetti, R.; Trio, R.; Labella, S.; Balato, N. The Impact of Obesity on Skin Disease and Epidermal Permeability Barrier Status. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **2010**, *24*, 191–195. [CrossRef]
39. Yosipovitch, G.; DeVore, A.; Dawn, A. Obesity and the Skin: Skin Physiology and Skin Manifestations of Obesity. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2007**, *56*, 901–916. [CrossRef] [PubMed]
40. Proksch, E. PH in Nature, Humans and Skin. *J. Dermatol.* **2018**, *45*, 1044–1052. [CrossRef]
41. Hachem, J.P.; Crumrine, D.; Fluhr, J.; Brown, B.E.; Feingold, K.R.; Elias, P.M. PH Directly Regulates Epidermal Permeability Barrier Homeostasis, and Stratum Corneum Integrity/Cohesion. *J. Investig. Dermatol.* **2003**, *121*, 345–353. [CrossRef]
42. Smythe, P.; Wilkinson, H.N. The Skin Microbiome: Current Landscape and Future Opportunities. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 3950. [CrossRef]
43. Yew, Y.; Thing, T.; Chambers, J.; Chian, L. Relationship of Adiposity and Skin Epidermal Barrier Status: Results from an Asian General Population Cohort Study. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2019**, *81*, AB117.
44. Ibuki, A.; Kuriyama, S.; Toyosaki, Y.; Aiba, M.; Hidaka, M.; Horie, Y.; Fujimoto, C.; Isami, F.; Shibata, E.; Terauchi, Y.; et al. Aging-like Physiological Changes in the Skin of Japanese Obese Diabetic Patients. *SAGE Open Med.* **2018**, *6*, 1–6. [CrossRef]
45. Misiorek, A.; Szyszkowska Kępińska, M. Evaluation of the Influence of Whole-Body Cryotherapy on Selected Skin Parameters in Healthy Individuals: Pilot Study. *Cryobiology* **2021**, *100*, 77–80. [CrossRef]
46. Du Plessis, J.L.; Stefaniak, A.B.; Wilhelm, K.P. Measurement of Skin Surface PH. *Curr. Probl. Dermatol.* **2018**, *54*, 19–25. [CrossRef]
47. Liu, M.; Feng, J. Association between Adiposity and Facial Aging: Results from a Mendelian Randomization Study. *Eur. J. Med. Res.* **2023**, *28*, 350. [CrossRef]
48. Santos, A.L.; Sinha, S. Obesity and Aging: Molecular Mechanisms and Therapeutic Approaches. *Ageing Res. Rev.* **2021**, *67*, 101268. [CrossRef]
49. Kruglikov, I.L.; Scherer, P.E. Skin Aging: Are Adipocytes the next Target? *Aging* **2016**, *8*, 1457–1469. [CrossRef]
50. Enser, M.; Avery, N.C. Mechanical and Chemical Properties of the Skin and Its Collagen from Lean and Obese-Hyperglycaemic (*Ob/Ob*) Mice. *Diabetologia* **1984**, *27*, 44–49. [CrossRef]
51. Walker, J.M.; Garcet, S.; Aleman, J.O.; Mason, C.E.; Danko, D.; Zuffa, S.; Swann, J.R.; Krueger, J.; Breslow, J.L.; Holt, P.R. Obesity and Ethnicity Alter Gene Expression in Skin. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 14079. [CrossRef] [PubMed]
52. Sorop, O.; Olver, D.; Van De Wouw, J.; Heinonen, I.; Van Duin, R.W.; Duncker, D.J.; Merkus, D. The Microcirculation: A Key Player in Obesity-Associated Cardiovascular Disease. *Cardiovasc. Res.* **2017**, *113*, 1035–1045. [CrossRef] [PubMed]

53. Pilch, W.; Wyrostek, J.; Major, P.; Zuziak, R.; Piotrowska, A.; Czerwińska-Ledwig, O.; Grzybkowska, A.; Zasada, M.; Ziemann, E.; Żychowska, M. The Effect of Whole-Body Cryostimulation on Body Composition and Leukocyte Expression of HSPA1A, HSPB1, and CRP in Obese Men. *Cryobiology* **2020**, *94*, 100–106. [CrossRef]
54. Loap, S.; Lathe, R. Mechanism Underlying Tissue Cryotherapy to Combat Obesity/Overweight: Triggering Thermogenesis. *J. Obes.* **2018**, *2018*, 5789647. [CrossRef]
55. Lubkowska, A.; Dudzińska, W.; Bryczkowska, I.; Dołęgowska, B. Body Composition, Lipid Profile, Adipokine Concentration, and Antioxidant Capacity Changes during Interventions to Treat Overweight with Exercise Programme and Whole-Body Cryostimulation. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2015**, *2015*, 803197. [CrossRef]
56. Ziemann, E.; Olek, R.A.; Grzywacz, T.; Antosiewicz, J.; Kujach, S.; Łuszczyk, M.; Smaruj, M.; Śledziewska, E.; Laskowski, R. Whole-Body Cryostimulation as an Effective Method of Reducing Low-Grade Inflammation in Obese Men. *J. Physiol. Sci.* **2013**, *63*, 333–343. [CrossRef]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Publikacja nr 5 ***Effect of a series of whole-body cryostimulation treatments on vaspin levels in subjects with different body mass indexes***

ACTA BALNEOLOGICA, VOLUME LXVII, ISSUE 2, MARCH-APRIL 2025
© Aluna Publishing

ORIGINAL ARTICLE

Effect of a series of whole-body cryostimulation treatments on vaspin levels in subjects with different body mass indexes

Adrianna Dzidek, Olga Czerwińska-Ledwig, Roxana Zuziak, Joanna Kryst, Marta Morawiec, Anna Piotrowska

UNIVERSITY OF PHYSICAL CULTURE, KRAKOW, POLAND

ABSTRACT

Aim: To analyze the effect of WBC treatment on waspin levels in subjects with normal and elevated BMI.

Materials and Methods: Twenty-three participants were divided into a study group (BMI >27) and a control group (BMI: 18.5-25). Blood samples were collected before 1st (I), after 9th (II) and 19th (III) treatment and 2 weeks after the serie was completed (IV).

Results: Changes in vaspin levelss have been reported in study group (p=0.026). Initially, an increase in adipokine level was observed (I vs. II; p=0.013), with a subsequent decrease (II vs. III; p=0.062) after 20 sessions WBC.

Conclusions: The effect of WBC on vaspin regulation and its potential use in obesity treatment will depend on the number of treatments and BMI.

KEYWORDS: obesity, adipokines, vaspin, whole body cyrotherapy, cryostimulation

Acta Balneol. 2025;67(2):114-120. doi: 10.36740/ABAL202502106

INTRODUCION

According to the World Health Organization (WHO), in 2022. 16% of adults characterized by obesity and 43% overweight [1]. The global epidemic of obesity has fueled research on adipose tissue and the factors that influence it. There is now a growing body of data in the literature on the potential of whole body cryotherapy (WBC) as a non-pharmacological adjunct to the treatment of obesity, metabolic disorders [2,3] and improvement of lipid profile [4, 5].

WBC is defined as the technique of extreme cooling of the body (below -100°C) for a short period of time (1-3 min) to induce a physiological response to the cold [6]. The analgesic, anti-edema, anti-hemorrhagic, anti-inflammatory and anti-oxidative effects of cryogenic temperatures are indicated [7–9]. Positive effects on sleep quality are also indicated [10]. The purpose of cryotherapy is not to cool the tissue, but to induce mechanisms to transfer heat from warmer tissue to lower temperature tissue [11].

Adipose tissue is made up of adipocytes and is constantly undergoing remodeling. It is characterized by almost unlimited hypertrophy. It has storage, thermoregulatory and protective functions for internal organs. It is also an endocrine organ that secretes chemokines, cytokines and adipokines [12].

Adipokines are biologically active substances secreted under the influence of various stimuli. Their source is mainly white adipose tissue (WAT) and often the amount of adipokines released is correlated with the amount of WAT. Within adipose tissue, adipokines have been shown to modulate adipogenesis, immune cell migration into adipose tissue, and adipocyte metabolism and function [13]. They also have the ability to affect farther organs and tissues [14]. Obese individuals are characterized by an imbalance of pro- and anti-inflammatory adipokines. This dysregulation contributes to the chronic low-grade inflammation characteristic of obesity [15].

Vaspin (VASP, visceral adipose tissue-derived serpin), a serpin 12 derived from visceral adipose tissue, was discovered in 2005 [16]. It is produced in VAT and subcutaneous adipose tissue, skin, liver, pancreas, placenta, stomach, cerebrospinal fluid, hypothalamus and ovaries [17]. WAT has been identified as one of waspin's target organs of action, and the mechanism likely involves normalizing the mRNA expression of glucose transporter-4 (GLUT4), leptin, resistin and adiponectin [16]. This serpin has protease activity and it has been indicated that its targets are calicrein 7 and 14, which are involved in skin exfoliation. Vaspin-heparin interactions have also been described, which accelerate the inhibition of kallikrein 7 [18].

Blood levels of VASP vary with the amount of body fat and are positively correlated with BMI. Significantly lower levels of waspin were observed in the serum of underweight children compared to controls, while gene expression for this serpin is up-regulated with increasing body weight [18]. Higher levels of waspin are indicated in people with insulin resistance and type II diabetes [19]. Chang et al.[20] noted that with moderate weight loss, serum waspin levelss decreased, accompanied by improvements in insulin resistance-related parameters.

VASP is also involved in appetite regulation and its level fluctuates diurnally [21]. Based on studies in rats

and humans, several regulators of VASP expression in VAT have been described. Its serum levels increased with insulin resistance, obesity and elevated leptin levels and decreased with weight loss [18]. Up-regulation was observed in liver and brown adipose tissue (BAT) after exposure to a high-fat diet [18]. And although little is still known about the physiological stimuli affecting the expression and secretion of VASP, the possibility of its up-regulation points to potential applications in the treatment of obesity and related diseases.

AIM

The aim of the present study was to analyze the effects of a single treatment, as well as a series of 10th and 20th treatments of systemic cryotherapy, on the VASP profile in subjects with normal and elevated BMI.

MATERIALS AND METHODS

STUDY GROUP

A group of volunteers was recruited for the study, from which normal-weight and overweight or obese subjects were selected [23]. A medical history was taken in each group to verify inclusion and exclusion criteria (Table 1).

Study volunteers were grouped according to the indicated criteria – a study group (SG) with a BMI (Body Mass Index) above 27 and a control group (CG) with a BMI within the normal range (18-25). The study group (SG), which consisted of individuals with increased body fat, was matched on a pairing basis (age, gender) with participants who constituted the control group (CG). Ultimately, 23 subjects completed the project (Fig.1).

Participants were familiarized with the study protocol and signed consent forms before the study began. Participation was completely voluntary. Each volunteer was informed that he or she could withdraw from the project at any stage of the project, without giving a reason. The project protocol was approved by the Bioethics Committee of the Regional Medical Chamber of Cracow (177/KBL/OIL/2023 dated 25/09/2023).

RESEARCH PROTOCOL

The study was preceded by a medical consultation, and included a series of 20 WBC treatments held daily (4 weeks excluding Saturdays and Sundays). It was permissible to miss a treatment once; with more absences, the participant was eliminated from the project. Prior to each entry into the cryochamber, blood pressure was checked (blood pressure above 160/100 mmHg prevented continued participation in the project).

Body composition measurements and blood draws were taken: before the first, 10th and 20th WBC treatments, and 2 weeks after completion of the entire series (Fig. 2).

BLOOD COLLECTION AND BIOCHEMICAL TESTS

Venous blood samples were collected by a laboratory diagnostician from the veins of the parietal fossa using a vacuum system (Vacumed). Blood was collected on an empty stomach. To obtain serum, blood was collected into tubes containing a clotting activator, clotted, then centrifuged and pipetted into cryoprobes. Until laboratory testing, the material was stored at -80°C. VASP determinations were carried out using ready-made, high-sensitivity reagent kits by immunoenzymatic assay (ELISA).

ANTHROPOMETRIC MEASUREMENTS

Height of the body was measured once using a Seca 216 (Germany) growth meter with an accuracy of 5mm. Body weight was measured using a Jawon Medical IOI-353-CE0197 scale (Korea). BMI was calculated for each volunteer.

CRYOTHERAPY

Preparation for the procedure was conducted according to generally accepted standards. Volunteers were asked to remove jewelry, glasses, and dress in appropriate attire: a cap, a mask covering the nose and mouth, a bathing suit/shorts, gloves, gaiters or long socks covering the tibias and knee joint, and clogs with a thick sole. Each WBC procedure included a 30-second acclimatization in the cryochamber atrium (-60°C) and a 3-minute treatment in the cryochamber proper (-120°C). Volunteers moved one behind the other, changing walking direction every 30 seconds. They also exited the cryochamber through its atrium. Immediately after the treatment, the probationers performed aerobic exercises. Each treatment took place under the supervision of a specialist. Participants were informed that they could leave the cryochamber early if they felt unwell.

STATISTICAL ANALYSIS

The analysis was performed using JASP 0.16.4 software (University of Amsterdam, Amsterdam, the Netherlands). The results obtained were presented using basic descriptive

Table 1. Criteria considered in the process of qualifying participants for the project

Inclusion criteria	Exclusion criteria
– BMI > 27 for the study group; – BMI 18.5 - 25 for the comparison group; – No use of winter baths during the study and at least 6 months before; – Non-use of systemic cryotherapy at least 6 months prior; – Written consent for voluntary participation in the study; – Consent of the qualifying physician.	– Chronic endocrine and dermatological diseases; – Skin conditions of fungal, bacterial or viral origin; – Health problems (neurological, orthopedic) that prevent independent movement; – Taking anti-inflammatory medications and supplements containing vitamins and antioxidants; – Lack of consent to participate in the study.

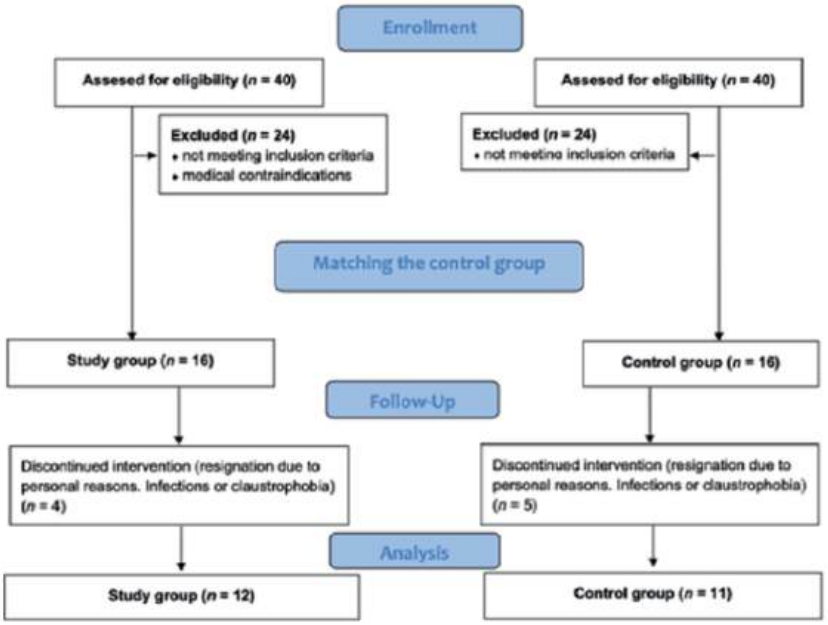


Fig.1. Patient flow chart.

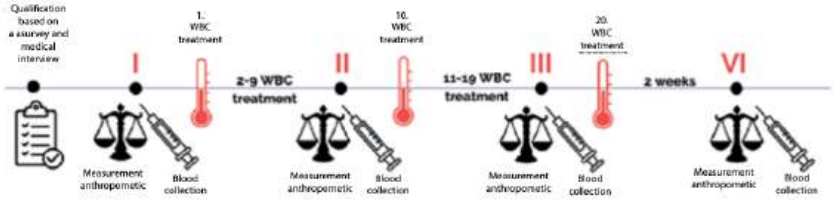


Fig. 2. Research flow chart.

statistics. The type of distribution of variables was analyzed using the Shapiro-Wilk test. Group characteristics were compared using Student's t-tests. ANOVA analysis with repeated measures (RMANOVA) was performed. If the assumption of sphericity was violated (Mauchly test), Greenhouse-Geisser corrections were applied. For variables with a non-normal distribution, the nonparametric Friedman test was used, with Conover's test as a post hoc test. Effect sizes were calculated using the Omega2 coefficient (ω2) and interpreted as follows: 0.01 – small, 0.06 – medium and 0.14 – large effect. The presence of correlation was checked using Spearman's test (rho). The level of significance (α) was set at $p<0.05$ in each case.

RESULTS

CHARACTERISTICS OF THE GROUPS

The study group (SG) consisted of 6 women and 6 men. The control group (CG) consisted of 8 women and 3 men. Details are provided in Table 2.

VASP LEVELS IN THE NORMAL AND ELEVATED BMI GROUPS

The results of VASP levels are shown in Table 3. and Fig. 3. No significant differences were indicated between the baseline VASP levels for the two groups. The lack of differences between the study and control groups persisted at each measurement point.

EFFECT OF SERIES OF SYSTEMIC CRYOTHERAPY TREATMENTS ON VASP LEVEL

To illustrate the effect of a series of cryotherapy treatments on VASP level, the results performed in consecutive measurements (I-IV) were compared with each other (Fig. 4). There was a difference at the trend level ($p=0.059$) between the 1st and 2nd measurements. Further analysis indicated a significant change in VASP level in SG ($p=0.026$). Subsequent tests indicated a significant increase in adipokine level after a series of 10 treatments ($p=0.003$), with a subsequent decrease after a series of 20 treatments (within the range

Table 2. Characteristics of the group

	SG		CG		p SG vs. CG
	$\bar{\chi}$	SD	$\bar{\chi}$	SD	
Age [years]	43.92	13.08	43.55	11.5	0.989
Weight [kg]	92.7	12.96	69.13	10.34	0.006
Height [cm]	171.67	8.34	171.36	8.65	0.839
BMI [kg/m²]	31.34	2.57	23.47	2.29	<0.001

SG – study group, GC – control group, $\bar{\chi}$ – average, SD – standard deviation, BMI – body mass index

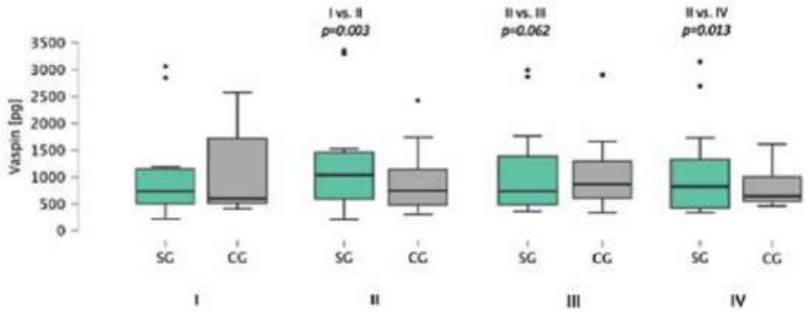


Fig. 3. Changes in VASP level over time in SG (study group) and CG (control group).

Table 3. Results of waspin level (pg) before the project (I) before 10 (II) and 20 systemic cryotherapy treatments (III) and 2 weeks after the treatment series was completed (IV)

	SG					CG					p SG vs. CG
	$\bar{\chi}$	SD	Med	Min	Max	$\bar{\chi}$	SD	Med	Min	Max	
I	1075.06	935.26	734.50	227.83	3064.50	1085.11	809.80	602.83	411.17	2569.50	0.978
II	1300.06	1023.77	1038.67	212.83	3356.17	942.98	649.07	746.17	302.83	2426.17	0.334
III	1148.94	938.47	737.00	362.83	2989.50	1076.49	733.29	877.75	351.17	2906.17	0.840
IV	1124.92	941.70	827.00	344.50	3149.50	843.31	377.04	657.75	477.75	1622.75	0.410

*SG – test group, GC – control group, $\bar{\chi}$ – mean, SD – standard deviation, Med – median, Min – minimum value, Max – maximum value, * $p < 0.05$*

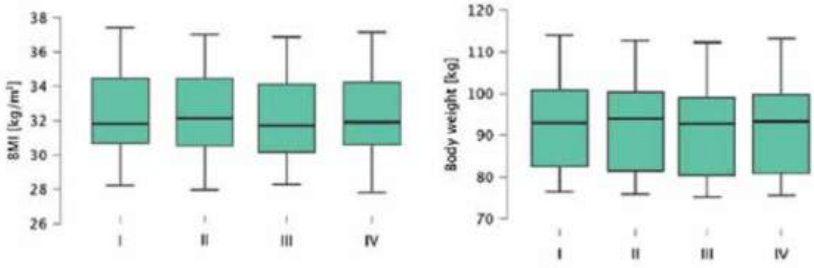


Fig. 4. Changes in BMI and weight in SG (study group).

of staystance trend: p=0.062). Results obser ved two weeks after the completed series indicated a further decrease in adipokine levels compared to the 2nd measurement (p=0.013). For the control group, there were no significant differences in any of the time measurements.

There was a statistically significant difference in BMI changes in the SG group (p=0.028; ω^2=0.001), but further analysis did not indicate a significant difference between. A similar relationship was noted for SG weight (p=0.030; ω^2<0.001). No differences were noted in CG.

No correlation was noted between VASP level and BMI. There was also no correlation indicated between adipokine levels and gender.

DISCUSSION

With the increasing popularity of winter water bathing and the use of cryotherapy treatments, there is an increase in research on the effects of cryogenic temperatures on the human body. These studies include the outer shell – the skin [22-24], which is the first organ to come into contact with the cold, and the inner shell – the adipose tissue [25] an important insulator that limits the effects of cryogenic temperatures and the factors it secretes [26].

Chronic cold exposure causes an increase in the activity and size of brown adipose tissue (BAT), initiating the processes of non-drone thermogenesis to maintain a constant body temperature [27]. Increased caloric intake also produces a similar effect, referred to as diet-induced thermogenesis [28]. On the other hand, adipocytes are assumed to be more sensitive to cooling than other cell types. Topical application of low temperatures initiates apoptosis of adipocytes while not affecting surrounding tissues. Subsequently, adipocytes are engulfed by macrophages and digested. The final result is a reduction in subcutaneous adipose tissue at the site of the stimulus [29].

Weiner et al. [30] reported an increase in VASP gene expression in cold-activated BAT in animal model studies. Although mRNA expression was increased, plasma VASP levels were reduced after cold exposure. Regarding the endocrine functions of VASP [16,18,31], increased expression of target proteases by cold exposure may increase VASP consumption and result in lower levels of this adipokine in the bloodstream [30].

Initially, there was a significant increase in VASP levels in SG, which may have just been related to the activation of adipose tissue in response to cold. After the next 10 treatments, there was a significant decrease in VASP level. This could be an expression of the body's adaptation to the cryogenic stimulus that occurred over time, or, as suggested by earlier authors, a consequence of increased protease expression under the influence of cryogenic temperatures [30].

In the current project, the effect of the treatments on BMI was indicated, however, only in the group with impaired values of this variable (SG). An earlier study [25] z noted a reduction in body fat after a series of 20 WBC treatments. The decrease in VASP level after the final series of treatments, which persisted further in the follow-up measurement, may have been precisely related to the decrease in body fat observable by Więcek et al. in obese subjects under the influence of WBC [25] or related to the increased gene expression and subsequent protein utilization previously described in the literature [30].

It has previously been pointed out [26, 32], hat the effect of low-temperature treatments on the human body is dependent on body composition, which is most likely related to the presence of adipose tissue acting as a thermal insulator. A study [24], on the effect of a series of WBCs on skin characteristics, also notes a similar relationship – the skin of obese people responded differently to a series of treatments than the skin of people with a normal BMI. In the group of people with a normal BMI, no significant changes were observed regarding VASP levels. And although the observed changes were statistically insignificant, the dynamics of change observed in Figure No.3 were different from those in SG.

The results of studies on VASP levels in obese and lean subjects are divergent [33, 34]. In the present study, it was noted that normal-weight subjects had lower VASP levels throughout the study period, but there were no significant correlations between VASP levels and BMI at any of the measurement points to support this claim. Korner et al. also noted no correlation between BMI and plasma VASP levels, but in their case the opposite relationship was noted – obese subjects had lower VASP levels.

On the other hand, some authors also note a sexual dimorphism regarding the value of circulating VASP levels in serum. Higher levels in women compared to men are indicated [19, 34]. Choi et al. [33] indicated a positive correlation between plasma VASP levels and BMI among men, but this relationship was not found in women. In the present study, both groups consisted of both men and women, which may have influenced the results. Subsequent studies including subjects with greater variation in BMI and gender could provide more insight into this topic.

CONCLUSIONS

Analysis of the data taken indicates that the effect of systemic cryostimulation on plasma VASP level is dependent on the BMI of the participants and the number of treatments applied in a series. The obese and overweight group was more sensitive to the cryogenic stimulus. A significant increase in the level of the tested serpin before the 10th treatment was observed in those with an increased BMI, while prolonging the series no longer yielded significant changes in the level of waspin. The profile of changes in subjects with a normal BMI appears different, but further studies with gender breakdown, greater group differentiation and larger numbers are needed.

STUDY LIMITATION

The strength of the present study is its innovation: for the first time, the effect of WBC treatments applied in a standard (10 treatments) and extended (20 treatments) series on the plasma VASP profile was observed. The study

also has some limitations. Study participants were matched on a pairing basis in terms of study group characteristics. However, the final sizes of the two groups were small. Also, changes in vaspin levels were not studied in subjects who did not use WBC at the same time (passive control group). Future projects should also consider gender and obesity type as variables that may affect the direction of WBC-induced changes.

REFERENCES

1. Obesity and overweight. WHO. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight; [Accessed 10 March 2025]
2. Wiecek M, Szymura J, Sproull J, Szygula Z. Decreased blood asprosin in hyperglycemic menopausal women as a result of whole-body cryotherapy regardless of metabolic syndrome. J Clin Med. 2019;8(9). doi:10.3390/jcm8091428.
3. Pilch W, Wyrostek J, Piotrowska A et al. Blood pro-oxidant/antioxidant balance in young men with class II obesity after 20 sessions of whole body cryostimulation: a preliminary study. Redox Report. 2021;26(1):10-17. doi:10.1080/13510002.2021.1881328.
4. Stanek A, Romuk E, Wielkoszyński T et al. Decreased Lipid Profile and Oxidative Stress in Healthy Subjects Who Underwent Whole-Body Cryotherapy in Closed Cryochamber with Subsequent Kinesiotherapy. Oxid Med Cell Longev. 2019:7524878. doi:10.1155/2019/7524878.
5. Lubkowska A, Banfi G, Dołegowska B et al. Changes in lipid profile in response to three different protocols of whole-body cryostimulation treatments. Cryobiology. 2010;61(1):22-6. doi: 10.1016/j.cryobiol.2010.03.010.
6. Sieron A, Cieslar G, Stanek A. Cryotherapy: Theoretical Bases, Biological Effects, Clinical. α-Medica Press. 2010.
7. Ciosek Ż, Drozd A, Szylińska A et al. Działanie krioterapii ogólnoustrojowej i kinezyterapii na ciśnienie tętnicze. [The effect of systemic cryotherapy and kinesiotherapy on blood pressure]. Pomeranian J Life Sci. 2016;62(2):22-25. (Polish)
8. Freire B, Geremia J, Baroni BM, Vaz MA. Effects of cryotherapy methods on circulatory, metabolic, inflammatory and neural properties: a systematic review. Fisioterapia em Movimento. 2016;29(2):389-398. doi:10.1590/0103-5150.029.002.ao18.
9. Stanek A, Wielkoszyński T, Bartuś S, Cholewka A. Whole-Body Cryostimulation Improves Inflammatory Endothelium Parameters and Decreases Oxidative Stress in Healthy Subjects. Antioxidants (Basel). 2020;9(12):1308. doi: 10.3390/antiox9121308.
10. Douzi W, Dupuy O, Tanneau M et al. 3-min whole body cryotherapy/cryostimulation after training in the evening improves sleep quality in physically active men. Eur J Sport Sci. 2019;19(6):860–867. doi: 10.1080/17461391.2018.1551937.
11. Fayyad DM, Abdelsalam N, Hashem N. Cryotherapy: A New Paradigm of Treatment in Endodontics. J Endod. 2020;46(7):936-942. doi:10.1016/j.joen.2020.03.019.
12. Zwick RK, Guerrero-Juarez CF, Horsley V, Plikus MV. Anatomical, Physiological, and Functional Diversity of Adipose Tissue. Cell Metab. 2018;27(1):68-83. doi:10.1016/j.cmet.2017.12.002.
13. Siemińska L. Tkanka tłuszczowa. Patofizjologia, rozmieszczenie, różnice płciowe oraz znaczenie w procesach zapalnych i nowotworowych. [Adipose tissue. Pathophysiology, distribution, sex differences, and importance in inflammatory and neoplastic processes]. Pol J Endocrinol. 2007;58(4):330-342. (Polish)
14. Skowrońska B, Fichna M, Fichna P. Rola tkanki tłuszczowej w układzie dokrewnym. [The role of adipose tissue in the endocrine system]. Endokrynologia, Otyłość i Zaburzenia Przemiany Materii. 2005;1(3):21-29. (Polish)
15. Taylor EB. The complex role of adipokines in obesity, inflammation, and autoimmunity. Clin Sci. 2021;135(6):731-752. doi:10.1042/CS20200895.
16. Hida K, Wada J, Eguchi J et al. Visceral Adipose Tissue-Derived Serine Protease Inhibitor: A Unique Insulin-Sensitizing Adipocytokine in Obesity. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(30):10610-5.
17. Würfel M, Blüher M, Stumvoll M et al. Adipokines as Clinically Relevant Therapeutic Targets in Obesity. Biomedicines. 2023;11(5). doi:10.3390/biomedicines11051427.
18. Kurowska P, Mlyczyńska E, Dawid M et al. Review: Vaspin (SERPINA12) expression and function in endocrine cells. Cells. 2021;10(7). doi:10.3390/cells10071710.
19. Youn BS, Klöting N, Kratzsch J et al. Serum vaspin concentrations in human obesity and type 2 diabetes. Diabetes. 2008;57(2):372-377. doi:10.2337/db07-1045.
20. Chang HM, Lee HJ, Park HS et al. Effects of weight reduction on serum vaspin concentrations in obese subjects: Modification by insulin resistance. Obesity. 2010;18(11):2105-2110. doi:10.1038/oby.2010.60.
21. Jeong E, Youn BS, Kim DW et al. Circadian rhythm of serum vaspin in healthy male volunteers: Relation to meals. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 2010;95(4):1869-1875. doi:10.1210/jc.2009-1088.
22. Skrzek A, Ciszek A, Nowicka D, Dębiec-Bąk A. Evaluation of changes in selected skin parameters under the influence of extremely low temperature. Cryobiology. 2019;86:19-24. doi:10.1016/j.cryobiol.2019.01.005.
23. Piotrowska A, Aszklar K, Dzidek A et al. The impact of a single whole body cryostimulation treatment on selected skin properties of healthy young subjects. Cryobiology. 2021;100:96-100. doi:10.1016/j.cryobiol.2021.03.003.
24. Dzidek A, Czerwińska-Ledwig O, Szlachetka A et al. Use of Measurement Probes to Evaluate the Effect of a Series of Whole-Body Cryostimulation Treatments on Skin Characteristics in Subjects with Different BMIs. Appl. Sci. 2025;15(6):2897. doi:10.3390/app15062897.
25. Wiecek M, Szymura J, Sproull J, Szygula Z. Whole-body cryotherapy is an effective method of reducing abdominal obesity in menopausal women with metabolic syndrome. J Clin Med. 2020;9(9):1-21. doi:10.3390/jcm9092797.
26. Pilch W, Piotrowska A, Wyrostek J et al. Different Changes in Adipokines, Lipid Profile, and TNF-Alpha Levels between 10 and 20 Whole Body Cryostimulation Sessions in Individuals with I and II Degrees of Obesity. Biomedicines. 2022;10(2). doi:10.3390/biomedicines10020269.
27. Cannon B, Nedergaard J. Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. Physiol Rev. 2004;84:277-359. doi:10.1152/physrev.00015.2003.
28. Soberg S, Löfgren J, Philipsen FE et al. Altered brown fat thermoregulation and enhanced cold-induced thermogenesis in young, healthy, winter-swimming men. Cell Rep Med. 2021;2(10). doi:10.1016/j.xcrm.2021.100408.

29. Kania B, Goldberg DJ. Cryolipolysis: A promising nonsurgical technique for localized fat reduction. J Cosmet Dermatol. 2023;(3):1-7.
30. Weiner J, Rohde K, Krause K et al. Brown adipose tissue (BAT) specific vaspin expression is increased after obesogenic diets and cold exposure and linked to acute changes in DNA-methylation. Mol Metab. 2017;6(6):482-493. doi:10.1016/j.molmet.2017.03.004.
31. Radzik-Zając J, Wytrychowski K, Wiśniewski A, Barg W. The role of the novel adipokines vaspin and omentin in chronic inflammatory diseases. Pediatr Endocrinol Diabetes Metab. 2023;29(1):48-52. doi:10.5114/pedm.2022.121371.
32. Fontana JM, Bozgeyik S, Gobbi M et al. Whole-body cryostimulation in obesity. A scoping review. J Therm Biol. 2022;106(103250). doi:10.1016/j.jtherbio.2022.103250.
33. Choi SH, Kwak SH, Lee Y et al. Plasma vaspin concentrations are elevated in metabolic syndrome in men and are correlated with coronary atherosclerosis in women. Clin Endocrinol (Oxf). 2011;75(5):628-635. doi:10.1111/j.1365-2265.2011.04095.x.
34. Körner A, Neef M, Friebe D et al. Vaspin is related to gender, puberty and deteriorating insulin sensitivity in children. Int J Obes. 2011;35(4):578-586. doi:10.1038/ijo.2010.196.

CONFLICT OF INTEREST
The Authors declare no conflict of interest

CORRESPONDING AUTHOR
Adrianna Dzidek
University of Physical Culture
78 Jana Pawła II St., 31-571 Krakow, Poland
e-mail: Adrianna.dzidek@awf.krakow.pl

ORCID AND CONTRIBUTIONSHIP
Adrianna Dzidek: 0000-0001-8437-1308 (A) (D) (F)
Olga Czerwińska-Ledwig: 0000-0003-1855-1276 (A) (B) (C) (F)
Roxana Zuziak: 0000-0002-7544-6096 (B) (C) (F)
Joanna Kryst: 0000-0003-4516-8723 (B) (D) (F)
Marta Morawiec: 0000-0003-1711-5675 (B) (D) (F)
Anna Piotrowska: 0000-0002-9535-173X (A) (B) (C) (E) (F)

(A) – Work concept and design, (B) – Data collection and analysis, (C) – Responsibility for statistical analysis, (D) – Writing the article, (E) – Critical review, (F) – Final approval of the article

RECEIVED: 29.01.2025
ACCEPTED: 07.04.2025

CREATIVE COMMONS 4.0

<u>Publikacja nr 6</u> ***The effect of whole-body cryostimulation treatments on the profile of selected adipokines and sirtuins in middle-aged individuals with varying degrees of body fatness***

Cryobiology 122 (2026) 105599

Contents lists available at ScienceDirect

Cryobiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cryo

The effect of whole-body cryostimulation treatments on the profile of selected adipokines and sirtuins in middle-aged individuals with varying degrees of body fatness

Adrianna Dzidek [a,b,*], Olga Czerwińska-Ledwig [b], Roxana Zuziak [b], Joanna Kryst [b], Marta Morawiec [c], Zbigniew Szyguła [d], Tomasz Pałka [e], Anna Kurkiewicz-Piotrowska [b]

[a] Doctoral School of Physical Culture Science, University of Physical Education, 31-571 Krakow, Poland
[b] Institute for Basic Sciences, Faculty of Physiotherapy, University of Physical Education, 31-571 Krakow, Poland
[c] Department of Aesthetic Cosmetology, Faculty of Physiotherapy, University of Physical Education, 31-571 Krakow, Poland
[d] Department of Sports Medicine and Human Nutrition, Faculty of Physical Education and Sport, University of Physical Education, 31-571 Krakow, Poland
[e] Department of Physiology and Biochemistry, Faculty of Physical Education and Sport, 31-571 Krakow, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:
Whole body cyrotherapy
Adipokines
Leptin
Asprosin
Adiponectin
Sirtuin
Obesity

ABSTRACT

Whole-body cryostimulation (WBC), a widely utilized intervention involving exposure to extremely low temperatures, elicits a range of physiological responses. Growing evidence suggests that WBC may serve as a complementary, non-pharmacological strategy for obesity management and the modulation of metabolic homeostasis. The aim of the study was to evaluate the effects of a series of WBC sessions on the profile of selected adipokines, sirtuins, and carbohydrate metabolism in individuals with normal and elevated BMI. A total of 23 volunteers participated in the study: 12 in the study group (SG; BMI >27) and 11 in the control group (CG; BMI 18.5-25). Blood samples were collected: prior to the 1st (I), after the 9th (II), after the 19th (III) WBC treatment, and two weeks following the cessation of the intervention (IV). The WBC series had a positive impact on fasting blood glucose (I vs II p=0.035; I vs III p=0.039), glycated hemoglobin (I vs IV p=0.004), and asprosin (I vs IV p = 0.020). A positive effect was observed in SG on levels of: asprosin (I vs IV $p < 0.001$), SIRT1 ($p < 0.001$), insulin (I vs III p=0.041, I vs IV p=0.013), and HOMA-IR (I vs III p=0.009, I vs IV p=0.009). The WBC series lowered leptin concentrations in SG (I vs III p=0.013) and CG (I vs III p=0.005). However, the downward trend did not continue in SG after the intervention was discontinued. A series of WBC sessions improved carbohydrate metabolism and modulated adipokine and sirtuin profiles, with the most pronounced effects observed in individuals with elevated BMI. However, this effect generally may require a longer treatment series.

1. Introduction

Whole-body cryostimulation (WBC) is defined as a technique of extreme cooling of the body (below −100 °C) for a short period of time (1-3 min) to induce a physiological response to cold [41]. The purpose of cryostimulation is not to cool the target tissue, but to induce the transfer of heat from warmer surrounding tissues to the colder area [11]. By directly affecting the entire body, cold as a stimulus used in WBC affects the endocrine and nervous systems [41]. It has been proven that exposure of the human body to cryogenic temperatures causes a number of beneficial biochemical and physiological reactions. In particular, analgesic, anti-inflammatory and anti-edema effects have been confirmed [6,44]. Cryogenic temperature therapy has been successfully applied in the management of patients with rheumatoid arthritis [40], multiple sclerosis [9], fibromyalgia [20], and, more recently, as an adjunct in the treatment of obesity [13,39,52].

Obesity is defined as excessive accumulation or abnormal distribution of body fat, which has an impact on health. Excessive body fatness is a known risk factor for many non-communicable diseases, which include hypertension, ischemic heart disease, type 2 diabetes and other disorders of carbohydrate metabolism, fatty liver or sleep apnea [25]. According to a report of the WHO (*World Health Organization)* published

* Corresponding author. Doctoral School of Physical Culture Science, University of Physical Education, 31-571 Krakow, Poland.
E-mail addresses: adrianna.dzidek@doctoral.awf.krakow.pl (A. Dzidek), olga.czerwinska@awf.krakow.pl (O. Czerwińska-Ledwig), roxana.zuziak@awf.krakow.pl (R. Zuziak), joanna.kryst@awf.krakow.pl (J. Kryst), marta.morawiec@awf.krakow.pl (M. Morawiec), zbigniew.szygula@awf.krakow.pl (Z. Szyguła), tomasz.palka@awf.krakow.pl (T. Pałka), anna.piotrowska@awf.krakow.pl (A. Kurkiewicz-Piotrowska).

https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2026.105599
Received 25 September 2025; Received in revised form 8 February 2026; Accepted 16 February 2026
Available online 26 February 2026
0011-2240/© 2026 Society for Cryobiology. Published by Elsevier Inc. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

2025, in 2022, 43% of adults aged 18 years and over were overweight and 16% were living with obesity. In 2024, 35 million children under the age of 5 were overweight [61]. Currently available treatment options for obesity include nutritional therapy, tailored physical activity, behavioral changes, pharmacotherapy and bariatric surgery [48]. In the context of the ongoing global obesity crisis, identifying effective complementary intervention strategies appears to be of critical importance for enhancing the likelihood of successful weight reduction and mitigating inflammation.

Adipose tissue has storage and thermal insulation functions, but also functions as an endocrine organ, secreting bioactive substances – adipokines [5,38]. Their source is mainly WAT (*white adipose tissue)* and the amount of adipokines released is often correlated with the amount of this adipose tissue [43]. The full set of human adipokines is not yet fully characterized, but more than 600 potentially secretory proteins have been identified [23]. Adipokines have the ability to affect other organs and tissues. Many of them are important in various physiological processes in the body [43]. Adipokines are involved in, among other things: fat distribution [28], appetite and satiety regulation [2], insulin secretion and sensitivity [22], endothelial function [27], inflammation [29], blood pressure [58] and homeostasis [16]. Obesity is associated with both quantitative and qualitative changes in adipose tissue. This directly affects adipokine secretion and may increase the risk of developing certain diseases, including metabolic diseases [37]. Higher concentrations of leptin (LEP) [30] and asprosin (ASP) [32] and lower concentrations of adiponectin (ADP) [1] are found in subjects with increased body weight compared to normal weight subjects. WBC treatments appear to have a positive effect on adipokines, as confirmed in previous preliminary studies [34,51]. WBC treatments are generally considered safe and have a limited number of contraindications [8,53].

Sirtuins in mammals constitute a group of seven proteins (SIRT 1-7) involved in the post-translational modification of proteins [4]. Sirtuins are crucial for preserving overall health and influence multiple biological pathways that contribute to lifespan extension [17]. SIRT1 regulates both gluconeogenesis and glycolysis, as well as gene transcription in response to stress stimuli, including inflammation, hypoxia and fasting. SIRT4 contributes to the maintenance of lipid homeostasis by inhibiting fatty acid biosynthesis. Both SIRT1 and SIRT4 affect insulin secretion from pancreatic β cells [15]. In addition to the well-known role of sirtuins in aging mechanisms, the review of the previous research [35] has highlighted the role of SIRT6 in regulating homeostasis and inflammatory processes [7]. Elevated expression of this protein has also been observed in individuals who exercise regularly and follow calorie-restricted diets. It has been indicated that multiple WBC treatments can be used as an adjunctive therapy to increase the concentration of selected sirtuins [55].

The aim of the present study was to analyze the effects of a single treatment, as well as a series of 10 and 20 treatments of systemic cryostimulation, on the profile of selected adipokines, sirtuines and carbohydrate metabolism in subjects with normal and elevated BMI.

2. Material and methods

2.1. Study group

A group of volunteers was recruited for the study, from which a control group (CG; normal weight subjects with BMI (18.5-25.0) and a study group (SG, overweight or obese subjects with BMI>27) were selected [47]. During the recruitment phase, the SG was matched on a pairwise basis (age, gender) with participants who constituted the CG. Ultimately, 23 subjects completed the study (Fig. 1).

Participants were familiarized with the study protocol and signed written informed consent forms before starting the study. A medical consultation was conducted for each participant prior to the study. Volunteers didn't present any medical conditions, including metabolic diseases nor any other contraindications indicated in the latest guidelines [3]. Participation was completely voluntary. Volunteers were informed that they could withdraw from the project at any stage, without providing a reason. The project protocol was approved by the Bioethics Committee of the Regional Medical Chamber of Cracow (no 177/KBL/OIL/2023 dated September 25, 2023).

2.2. Research protocol

The study included a series of 20 WBC treatments held daily (4 weeks, excluding Saturdays and Sundays). Volunteers were allowed to miss one treatment; participants with more absences were excluded from the project. Prior to each entry into the cryochamber, blood

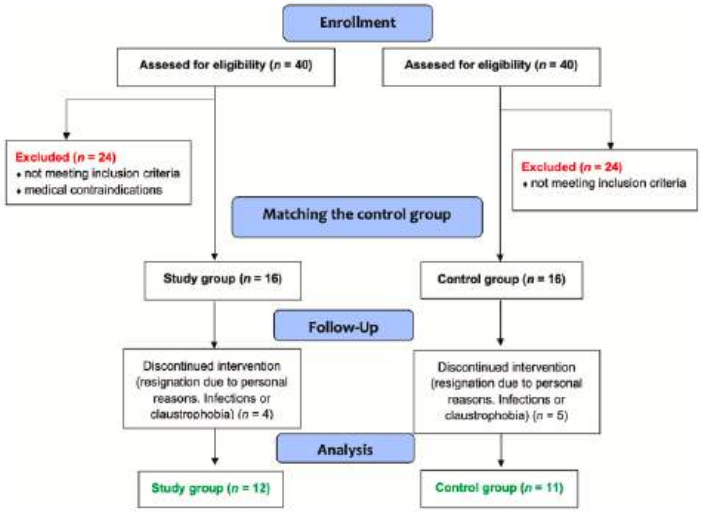


Fig. 1. Patient flow chart.

pressure measurements were performed (blood pressure above 160/100 mmHg was an exclusion criterion for continued participation in the project).

Body composition measurements and blood samples were taken before the 1st, 10th and 20th WBC treatments, and 2 weeks after cessation of cryostimulation (Fig. 2). A medical history was taken in each group to verify inclusion and exclusion criteria.

Exclusion criteria to cryostimulation:

Acute illnesses or infections, general malaise, skin lesions, severe anemia (Hb $\leq$ 80 g/L), electrolyte abnormalities, moderate-severe thrombocytopenia (PLT <50 $\times$ 109/L), pregnancy, cachexia, current therapy with cardiotoxic or spasmogenic drugs, claustrophobia, cold intolerance, organ insufficiency, age over 80 years, lack of written informed consent. Presence of diseases: cardiovascular; endocrinological; immunological, neurological/psychiatric, dermatological; oncological, ophthalmological [3].

2.3. Blood collection and evaluation of levels of biochemical parameters

Samples of venous blood were collected by a laboratory diagnostician from the veins of the antecubital fossa from probands using a vacuum system (Vacumed FL Medical, Italy). In order to obtain serum used for further analyses, blood was collected in tubes containing a coagulation activator, allowed to clot, then centrifuged and obtained serum was pipetted into cryotubes. After prior gradual freezing, the material was stored at −80 °C until the laboratory analyses were

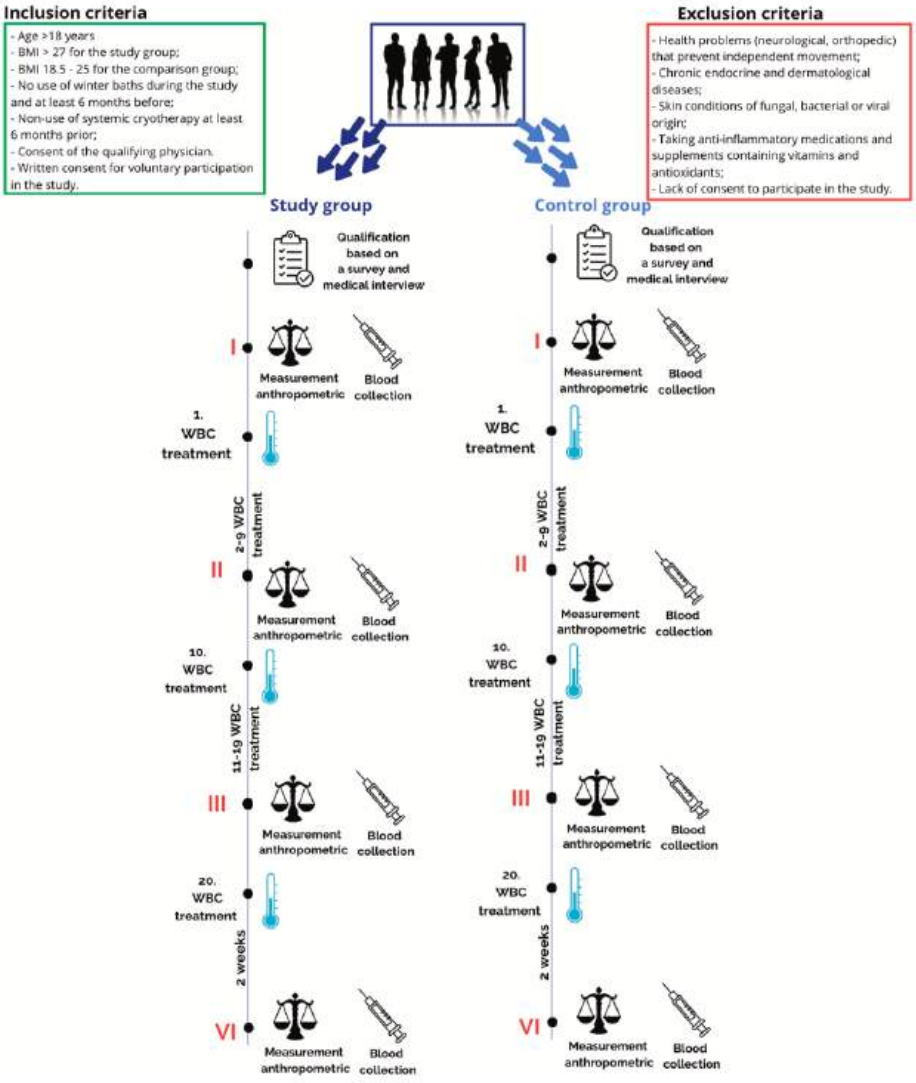


Fig. 2. Research flow chart.

performed. In addition, a test tube with a glycolysis inhibitor (sodium fluoride), was used to obtain serum for fasting blood glucose (FBG) measurement.

Adipokine and sirtuin protein concentrations were determined using ready-to-use high-sensitivity enzyme-linked immunosorbent assya (ELISA) reagent kits: LEP (DRG Instruments GmbH, Germany), ADP (Mediagnost, Germany) ASP and sirtuines (Sunredbio SRB Technology Co., Ltd, Shanghai) (Table 1.).

The indicators: FBG, insulin, fructosamine and glycated hemoglobin A1c (HbA1c) were determined in the medical diagnostic laboratory. To better illustrate carbohydrate metabolism, the HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance) and QUICKI (Quantitative Insulin Sensitivity Check Index) indices were calculated [19,24].

2.4. Antropometric measurments

Body weight was measured with a JAWON MEDICAL IOI-IOI-353-CE0197 scale (Jawon Medical Co., Ltd., Gyeongsan, Republic of Korea) using the bioimpedance method. Body height was measured once using a Seca 216 mechanical stadiometer (Hamburg, Germany), with an accuracy of ±5 mm. In addition, BMI was calculated for each volunteer. Waist and hip circumferences were measured using an anthropometric tape to the nearest 5 mm, as recommended by the WHO: waist - at the midpoint between the lower edge of the last rib arch and the apex of the iliac crest; hips - at the maximum circumference over the buttocks [62]. Ratios were calculated for each proband: WHtR (Waist to Height Ratio), defined as the ratio of waist circumference to height, and WHR (Waist to Hip Ratio), defined as the ratio of waist circumference to hip circumference.

2.5. Cyrostimulation

Preparation for the procedure followed standard protocols. Before the cryostimulation treatment, probands were asked to remove jewellery, contact lenses and glasses, and to dress in appropriate attire: a bathing suit/shorts, gaiters or long socks covering the tibias and knee joints, clogs with thick soles, gloves, cap and a mask covering the nose and mouth. Each WBC procedure included a 30-s acclimatization in the cryochamber atrium (−60 °C) and a 3-min treatment in the cryochamber proper (−120 °C). Probands walked one behind another, changing walking direction every 30 s. They exited the cryochamber through its atrium. After the treatment, the probands performed aerobic exercises. Each procedure was performed under the supervision of a specialist who observed the volunteers throughout the procedure. Participants were also informed that they could leave the cryochamber session early if they felt unwell.

2.6. Statistical analysis

The results were analyzed using JASP version 0.19.3 software (University of Amsterdam, Amsterdam, the Netherlands). The results obtained were presented using basic descriptive statistics. The distribution of variables was analyzed using the Shapiro-Wilk test. Group characteristics were compared using Student's t-tests. Repeated-measures analysis of variance (RMANOVA) was performed. If the assumption of sphericity was violated (Mauchly test), Greenhouse-Geisser corrections were applied. For variables with a non-normal distribution, the nonparametric Friedman test was used, with Conover's test as a post hoc test. The nonparametric Mann-Whitney test was used to compare two independent groups with a non-normal distribution. Effect sizes were calculated using the omega-squared coefficient (ω^2) and interpreted as follows: 0.01 - small, 0.06 - medium and 0.14 - large effect. The presence of correlations was checked using Spearman's test (rho). The level of significance (α) was set at $p < 0.05$ in each case.

Table 1
Characteristics of the tests.

	Test	Sensitivity
Leptin	Leptin Sandwitch ELISA; DRG Instruments GmbH, German	0.7 ng/ml
Adiponectin	Adiponectin ELISA; Mediagnost, Germany	<0.27 ng/ml
Asprosin	Human (asprosin) ELISA Kit; sunredbio (SRB) Technology Co.,Ltd, Shanghai	0.756 ng/ml
SIRT1	Human (SIRT1) ELISA Kit; sunredbio (SRB) Technology Co.,Ltd, Shanghai	0.306 ng/ml
SIRT4	Human (SIRT4) ELISA Kit; sunredbio (SRB) Technology Co.,Ltd, Shanghai	0.106 ng/ml
SIRT6	Human (SIRT6) ELISA Kit; sunredbio (SRB) Technology Co.,Ltd, Shanghai	0.306 ng/ml

3. Results

3.1. Subjects' characteristics

The study group (SG) included six women and six men. The control group (CG) consisted of 8 women and 3 men. Detailed characteristics of each group are shown in Table 2.

3.2. Effect of a series of systemic cryostimulation treatments on body composition

The applied intervention did not have a significant effect on the body weight of the study participants. There was a statistically significant difference in BMI changes in the SG group ($p = 0.028$; $\omega^2 = 0.001$), but further analysis did not indicate a significant difference between subjects. No differences were noted in CG.

Differences were indicated for WHtR, both over time ($p < 0.001$; $\omega^2 = 0.004$) and within group ($p = 0.010$; $\omega^2 = 0.002$). A group effect was also observed ($p < 0.001$). Further analyses indicated significant differences between measurements I vs II ($p = 0.043$), I vs III ($p = 0.002$) and I vs IV ($p = 0.001$). When analyzing the groups separately, significant changes were observed exclusively in the SG group between time points I and III ($p < 0.001$) and between I and IV ($p < 0.001$) (Fig. 3).

3.3. Effect of a series of systemic cryostimulation treatments on carbohydrate metabolism

Both groups were within the reference values for all measured indicators of carbohydrate metabolism (Table 3).

Higher baseline values in insulin concentration ($p = 0.002$) in the SG were indicated. The WBC series resulted in a significant reduction in insulin concentration in SG (I vs. III $p = 0.041$; I vs. IV $p = 0.013$). The CG showed an increase in insulin after 10 treatments (I vs. II $p = 0.024$), with a subsequent decrease after the treatment series was completed, but at each stage the values were within the reference range (II vs. III $p = 0.035$) (Fig. 4).

Table 2
Characteristics of the group.

	SG		CG		p SG vs. CG
	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	
Age [years]	43.92	13.08	43.55	11.5	0.989
Weight [kg]	92.7	12.96	69.13	10.34	**0.006***
Height [cm]	171.67	8.34	171.36	8.65	0.839
BMI [kg/m^2]	31.34	2.57	23.47	2.29	**<0.001***
WHR	0.95	0.08	0.86	0.06	**0.010***
WHtR	0.59	0.04	0.47	0.05	**<0.001***

SG-study group, GC-control group, $\bar{x}$– average value, SD–standard deviation, BMI-body mass index, WHR-waist to hip ratio, WHtR - waist to height ratio, *-statistically significant result for p < 0,05.

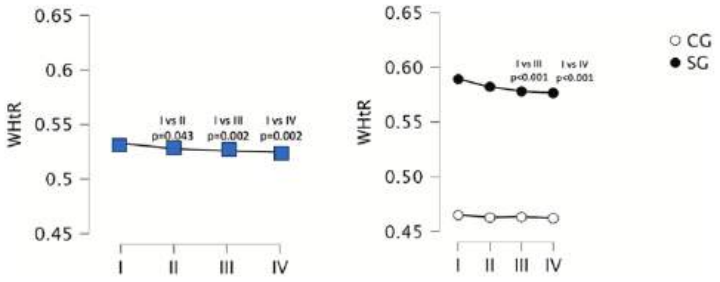


Fig. 3. Changes in WHtR level over time and over time in SG and in CG.

Table 3
Characterization of baseline values of carbohydrate metabolism.

	Reference values	SG		CG		*p* SG vs. CG
		$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	
Insulin [μIU/ml]	3-17	10.01	3.73	4.55	2.67	**0.002***
FBG [mmol/l]	3.9-5.5	5.39	0.53	4.90	0.49	0.876
Fructosamine [μmol/l]	205-285	241.33	19.63	242.91	10.13	1.000
HbA1c [mmol/mol]	20-42	38.92	2.91	36.73	3.72	0.190

SG-study group, GC-control group, $\bar{x}$– average value, SD–standard deviation, *-statistically significant result for $p < 0.005$.

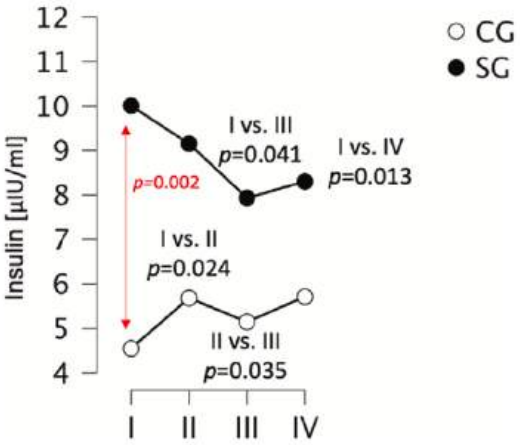


Fig. 4. Changes in insulin level over time in SG and in CG.

FBG concentrations changed significantly over the course of the project ($p = 0.035$ and $p = 0.039$ in measurements before the 10th and 20th treatments vs baseline measurements, respectively (Fig. 5.). A group effect was also observed ($p = 0.043$; $\omega^2 = 0.076$).

Two markers that provide insight into long-term glycemic control: fructosamine ($p < 0.001$; $\omega^2 = 0.061$) and HbA1c ($p = 0.004$; $\omega^2 = 0.004$) also changed their concentrations significantly. For fructosamine an effect of group ($p = 0.001$; $\omega^2 = 0.225$) was also observed. Post hoc analysis indicated that a significant time effect occurred in CG: I vs III ($p < 0.001$); I vs IV ($p < 0.001$); II vs III ($p < 0.001$), II vs IV ($p < 0.014$). A significant difference in fructosamine concentration between groups was also observed at the 3rd ($p < 0.001$) and 4th ($p = 0.003$) measurement points (Fig. 6). HbA1c differed significantly between the baseline measurement and that obtained at the last time point, i.e., 2 weeks after the intervention checkout (Fig. 7).

Higher HOMA-IR values were indicated in the SG at the 1st ($p < 0.001$) and 3rd ($p = 0.012$) measurement points. A change in the HOMA-IR index within time for SG was observed ($p = 0.032$). Further analysis indicated a significant decrease in the index after 20 WBC treatment ($p = 0.009$). This effect persisted in follow up (I vs IV $p = 0.009$) (Fig. 8). Higher baseline parameter values for CG were indicated ($p = 0.010$), as well as a significant difference within the group for the QUCIKI index ($p = 0.007$). A group effect was also observed ($p = 0.010$) (Fig. 9).

3.4. Effect of a series of systemic cryostimulation treatments on adipokines level

To illustrate the effect of a series of cryostimulation treatments on ASP, LEP and ADP levels, the results performed in consecutive measurements (I-IV) were compared with each other (Figs. 10 and 11).

A difference was indicated between the initial ASP concentration, and the concentration determined 2 weeks after the end of the intervention ($p = 0.020$). Further analysis of each group indicated, significant changes in SG ($p = 0.008$). Measurement taken 2 weeks after end of the intervention was significantly lower in 1st ($p < 0.001$); 2nd ($p = 0.006$) and 3rd ($p = 0.006$).

LEP concentrations were significantly higher in SGs at each measurement point (1st $p < 0.001$; 2nd $p = 0.017$; 3rd $p = 0.002$; 4th $p < 0.001$). An effect of time on LEP levels was indicated, which was observed in both SG ($p = 0.008$) and CG ($p = 0.006$). The greatest decrease in LEP during the SG series was observed after the 20th WBC treatment ($p = 0.013$). Two weeks after end of the intervention, LEP levels increased (III vs IV $p = 0.008$). In CG, changes were observed after both the 10th ($p = 0.023$) and 20th ($p = 0.005$) treatments compared to the 1st, and the decreasing trend continued at the IV measurement point as well (I vs IV $p = 0.002$).

No significant changes in ADP levels were indicated.

3.5. Effect of a series of systemic cryostimulation treatments on sirtuins level

The effect of the 10, and 20 treatments on level of sirtuin was checked. Different changes were indicated for SG and CG. An increase in SIRT1 was indicated in the SG group ($p = 0.006$). Changes in concentrations were noted between the 1st and 3rd measurement points ($p < 0.001$) and 2nd and 3rd ($p = 0.008$). The change was also observed between I and IV measurement point ($p = 0.008$). In CG, there was a decrease in SIRT1 concentration ($p = 0.015$), which was noted sequentially between measurement points I and III ($p < 0.001$) and II and III ($p = 0.034$). A difference was also evident between measurement

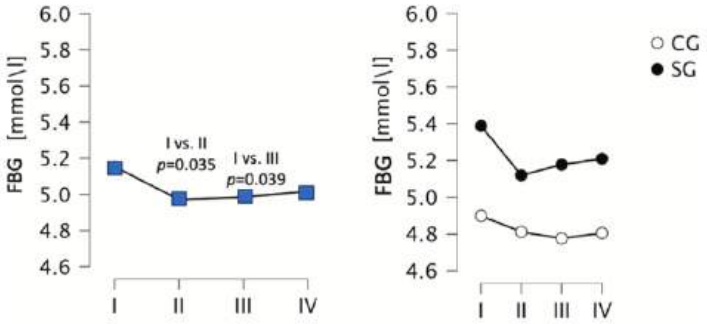


Fig. 5. Changes in FBG level over time and over time in SG and CG.

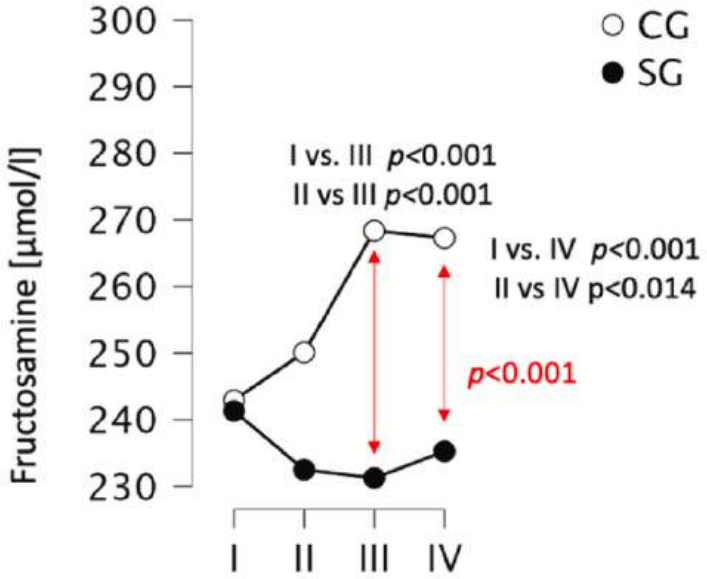


Fig. 6. Changes in fructosamine level over time in SG and CG.

I ($p = 0.005$) and II (0.021) and IV (Fig. 12).

There was a statistically significant increase in SIRT4 level 2 weeks after the completed treatment series (IV) compared to the 2nd measurement ($p = 0.048$). Post hoc analysis showed that the change was evident at the level of statistical significance in SG ($p=0.063$) (Fig. 13). A similar relationship was noted between the 2nd and 3rd measurement points for SIRT6, also in the SG group ($p = 0.071$). However, the assumed threshold of statistical significance was not reached. No significant changes were noted in the CG group (Fig. 14).

3.6. Correlation analysis

The results of the correlation analysis are presented in Table 4.

4. Discussion

Literature data indicate that WBC is emerging as a promising adjunctive intervention for the treatment of obesity. Beneficial effects of cryostimulation include a decrease in systemic inflammation, oxidative stress, body weight and abdominal obesity [13,54]. In the present research positive effects of WBC treatments on carbohydrate metabolism, LEP and ASP levels, SIRT 1 and SIRT4, as well as WHtR index have been demonstrated. However, it should be emphasized that the main limitation of this study remains the small and heterogeneous sample size. Future studies should include larger groups, divided by gender and body fat content.

Więcek et al. [49] reported a significant decrease in FBG and HbA1c after 30 WBC treatments, as well as a decrease in insulin and HOMA-IR and an increase in QUICKI two weeks after cessation of the intervention in postmenopausal women with type II diabetes mellitus (T2DM). In the control group, consisting of postmenopausal women but without T2DM, no significant changes were observed. In the present study, it has been shown that after a series of treatments of 20 WBC treatments FBG levels decreased significantly, and HbA1c 2 weeks after cessation of the

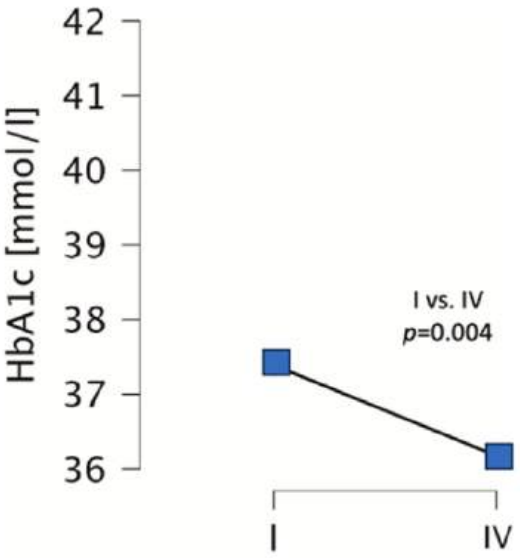


Fig. 7. Changes in HbA1c level over time.

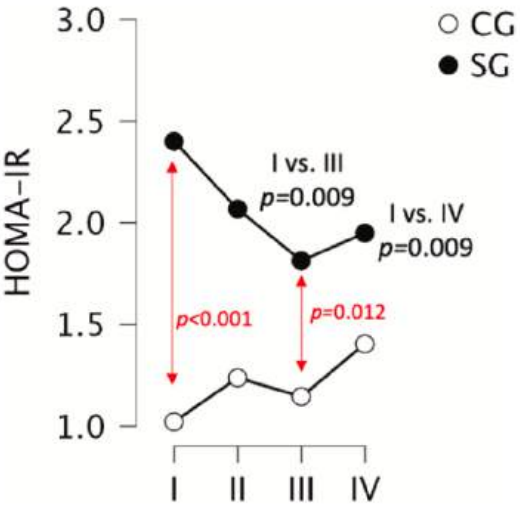


Fig. 8. Changes in HOMA-IR level over time in SG and CG.

intervention. Thiswas associated with adecrease in blood insulin observed after 20 WBC treatments and the improvement in the HOMA-IR insulin resistance index. The observed improvement in HOMA-IR suggests enhanced insulin sensitivity in SG. These effects were maintained at follow-up. A decrease in insulin levels and HOMA-IR were shown only in SG. Initially, higher insulin values were noted in SG, but this difference was no longer noted later, either during the series or in the follow-up. In CG, an increase in insulin was noted after the 10th WBC treatment, with a decrease again after the 20th WBC series. For fructosamine, the CG also showed an increase in values after the 20th WBC treatments. It is noteworthy, however, that despite the unfavorable

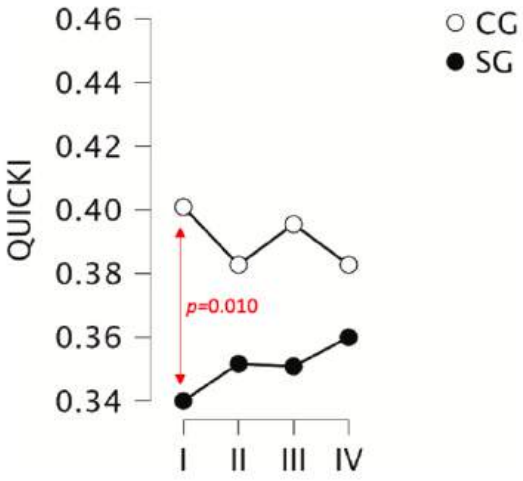


Fig. 9. Changes in QUICKI level over time in SG and CG.

direction of changes, the values of these parameters remained within reference ranges, suggesting that carbohydrate metabolism was not adversly affected.

Similar to previous studies conducted by Więcek et al. [37,44], the present study also dmeonstrated a significant reduction in ASP. ASP, secreted by WAT, modulates rapid glucose release from liver [36]. Romere et al. [36] indicated that in obese men with insulin resistance, its levels are pathologically elevated. They observed similar increases in two independent mouse models of insulin resistance (diet-induced obesity and Ob mutation). In obese mice with insulin resistance, an insulin-lowering effect was achieved through immune sequestration of ASP [36]. In this study a significant reduction in ASP was observed in the SG group, accompanied by a reduction in the HOMA-IR insulin resistance index. These data are consistent with the findings reported by Romere et al. [43].

However, a correlation was detected between another adipokines linked to obesity - LEP and ADP [18,28]. LEP serum concentrations correlated positively with BMI, WHtR, HOMA-IR and insulin and FBG (at follow up only) and negatively with QUICKI and fructosamine. In contrast, ADP levels correlated negatively with insulin and HOMA-IR and positively with QUICKI. The present study confirms previous findings - higher LEP levels [30] and lower ADP [1] were noted in the overweight and obese volunteers.

However, no changes in ADP concentrations were observed in the present study. In a study by other authors, there were also no changes in ADP concentrations, either with monotherapy [31,60], or with a combination of WBC and aerobic exercise [23]. Adiponetin reduces pro-inflammatory cytokines and oxidative stress, leading to improved insulin sensitivity. ADP inhibits hepatic glucose secretion and increases FBG and fatty acid utilization by skeletal muscle lowering FBG levels and resulting improved whole-body energy homeostasis [10,56]. Kozłowska et al.[21] indicated that a series of 10 WBC treatments resulted in an increase in adiponectin levels. Twenty-two men (age = 40 ± 13.5) participated in the study, and the increase in plasma ADP was accompanied by a decrease in insulin and FBG. This study did not indicate baseline differences in ADP levels between groups, and adiponectin correlated negatively only with insulin serum concentration. No correlation between FBG and ADP was indicated, threfore it can be concluded that the observed significant decrease in FBG was not related to an increase in ADP, but to an overall improvement in parameters of carbohydrate metabolism.

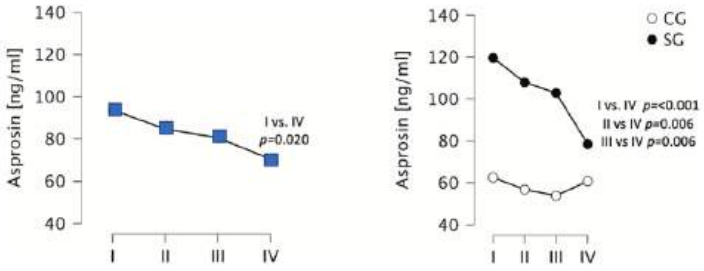


Fig. 10. Changes in asprosin level over time and over time in SG and CG.

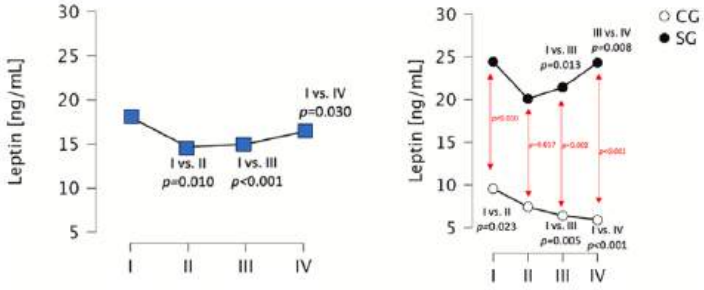


Fig. 11. Changes in leptin level over time and over time in SG and CG.

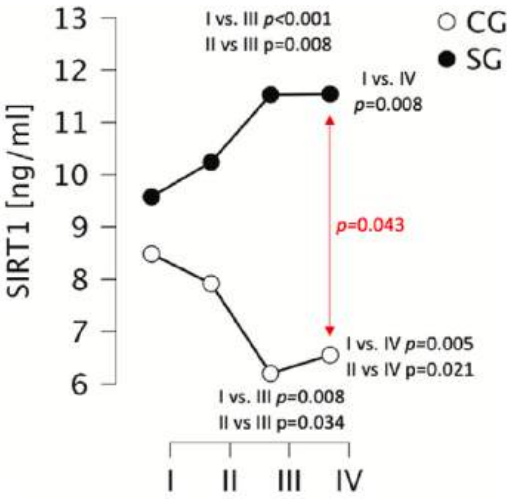


Fig. 12. Changes in SIRT1 level over time.

LEP is considered an adipokine that reveals a key role in weight regulation [14]. It affects the central nervous system, inhibiting food intake and stimulating energy expenditure [14,42,46]. In the literature, data on the effects of cryogenic temperatures on LEP concentrations are inconclusive. Pilch et al. [31] subjected overweight and obese subjects to a series of 20 WBC treatments. In the cited study, authors reported that between 10 and 20 WBC sessions there was a significant decrease in LEP serum concentration. The authors of the study suggest that for obese individuals, the number of treatments should be increased, above the standard number of 10. These data are consistent with those of the present study - in CG, a significant decrease was noted after the 10th treatment, but in SG only after a series of 20. Lubkowska et al. [23] evaluated the effect of a six-month exercise program with two exposures to WBC in 20 sessions on changes in, among others, LEP and ADP in obese individuals were assessed. They noted no change in the concentration of these adipokines. Więcek et al. [50] also found no change in LEP levels in menopausal women with metabolic disorders undergoing a series of 20 WBC treatments. Ptaszek et al. [33] indicated in their study a decrease in LEP levels after a series of 20 WBC treatments, but only in men; in women, there was an increase in LEP.

In this study, a series of WBC treatments significantly lowered LEP concentrations in both groups, but the analysis of the results obtained two weeks after the cessation of the intervention revealed a difference between the groups - in CG the downward trend continued, while in SG there was a significant increase in LEP concentrations. Tang et al.[45] pointed out the relationship between SIRT6 and LEP. They indicated that SIRT6 is an important regulator that promotes negative energy balance and can modulate LEP signaling, and SIRT6 deficiency leads to an impairment of leptin-induced phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). The present study indicated a negative correlation between SIRT6 and LEP, which confirms previous findings. However, no changes in SIRT6 activity or differences between groups were identified. The review [7] indicated that individuals with obesity have reduced SIRT6 adipose expression. They also noted a protective role for SIRT6 against the metabolic consequences of diet-induced obesity [7]. The lack of change in SIRT6 levels may be related to the unfavorable trends in LEP levels observed two weeks after the end of the series. It is also worth noting that, despite the lack of statistical significance, the trends in SIRT6 changes during follow-up were opposite to those in LEP.

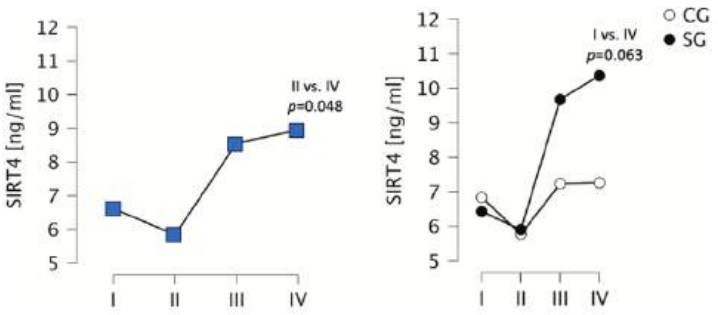


Fig. 13. Changes in SIRT4 level over time and over time in SG and CG.

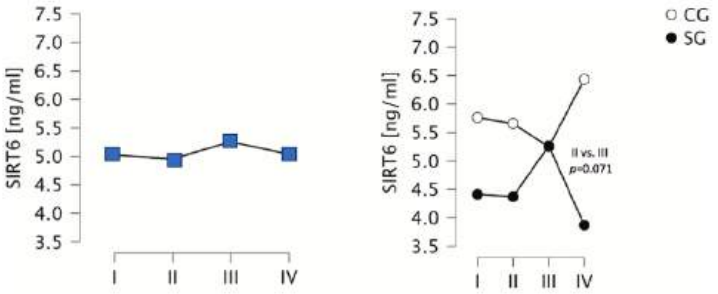


Fig. 14. Changes in SIRT6 level over time and over time in SG and CG.

This study demonstrated different directions of change in SIRT1 depending on the group. A series of 10 WBC treatments resulted in no significant changes, but after a series of 20 WBC treatments, there was a significant increase in SG and a significant decrease in CG. Expression of SIRT1 is strongly associated with inflammation in the body [57]. Abdominal obesity also has a significant impact on inflammation in the body. A study of healthy Japanese men found that those with abdominal obesity had higher levels of C-reactive protein (hs-CRP) and interleukin-6 (IL-6), and lower levels of ADP compared to those without abdominal obesity [26]. An indicator that reflects fat accumulated in the abdominal area is WHtR. It is suggested that this index is a better predictor of cardiometabolic risk factors and related diseases than WHR [12,35,59]. Although higher WHtR values were shown in SGs at each measurement point, analysis of the groups separately indicated that it was in this group that there was a significant decrease in the index after the treatment series, which persisted in the follow up. A positive correlation between SIRT1 and WHtR was found, but only at the 4th measurement point. At that time, WHtR decreased significantly and SIRT1 levels in SG increased, which may be due to a decrease in inflammation. However, further studies including inflammatory cytokines are needed to verify this theory.

Also, the presence of a positive correlation between WHtR and BMI, LEP and carbohydrate metabolism indices: FBG, insulin and HOMA-IR, and a negative correlation with QUICKI and fructosamine were indicated in the present study.

To the best of our knowledge, in our study, the effect of WBC on SIRT4 levels was studied for the first time. SIRT4 contributes to the maintenance of adequate lipid levels in the body by inhibiting fatty acid biosynthesis. It also reduces insulin secretion from pancreatic β-cells by inhibiting the action of glutamine dehydrogenase [15]. The positive effect of WBC on SIRT4 levels in the SG group may be related to the decrease in insulin in this group. On the other hand, however, an increase in SIRT4 levels may be, as in the case of SIRT1, associated with an improvement in WHtR, but in this case the mechanism would have to be linked to an improvement in body lipid levels. However, further studies assessing lipid levels are required to confirm or refute this hypothesis.

5. Conclusion

WBC appears to be a potential non-pharmacological adjunct intervention for excessive body weight and the management of obesity-related metabolic disturbances. WBC positively affects carbohydrate metabolism and obesity-associated adipokines leptin and adiponectin, as well as the activation of SIRT1 and SIRT4, with the most meaningful benefits observed in overweight and obese individuals. However, the achieved effects of cold therapy depend on the number of treatments and the individuals' BMI.

5.1. Study limitation

Study participants were matched in terms of study group characteristics. However, the final sizes of the two groups were small. Also, changes in adipokines and sirtuins levels were not studied in subjects who did not use WBC at the same time (passive control group). Future studies should be conducted with a larger number of volunteers, taking into account gender and type of obesity as variables that may influence the direction of these changes, which would provide a more complete picture of the impact of changes caused by WBC.

CRediT authorship contribution statement

Adrianna Dzidek: Writing – review & editing, Writing – original

Table 4
Spearman's correlations.

		1st		2nd		3rd		4th	
		r_p	p	r_p	p	r_p	p	r_p	p
BMI	Leptin	0.560	**0.002***	0.459	**0.024***	0.532	**0.010***	0.564	**0.009***
	WHR	0.626	**<0.001***	0.587	**0.003***	0.585	**0.004***	0.606	**0.003***
	WHtR	0.893	**<0.001**	0.869	**<0.001***	0.878	**<0.001***	0.907	**<0.001***
	HOMA-IR	0.529	**0.009***	-	-	0.494	**0.017***	-	-
	QUICKI	−0.535	**0.009***	-	-	−0.533	**0.009***	-	-
	Insulin	0.542	**0.008***	-	-	0.445	**0.003***	-	-
	Fructosamine	-	-	-	-	−0.690	**<0.001***	−0.582	**0.004***
Leptin	WHtR	0.474	**0.015***	0.493	**0.014***	0.549	**0.007***	0.521	**0.017***
	HOMA-IR	0.617	**0.002***	-	-	0.464	**0.026***	0.533	**0.009***
	QUICKI	−0.635	**0.001***	-	-	−0.489	**0.018***	−0.546	**0.010***
	Insulin	0.636	**0.001***	-	-	0.462	**0.026***	−0.538	**0.012***
	Fructosamine	-	-	−0.537	**0.008***	−0.596	**0.003***	−0.837	**<0.001***
	FBG	-	-	-	-	-	-	0.485	**0.026***
WHR	HOMA-IR	0.543	**0.007***	-	-	0.565	**0.005***	0.425	**0.048***
	QUICKI	−0.546	**0.007***	−0.462	**0.026***	−0.572	**0.004***	-	-
	FBG	0.459	**0.027***	-	-	0.466	**0.025***	-	-
	Insulin	0.535	**0.009***	-	-	0.514	**0.012***	-	-
	HbA1c	0.471	**0.031***	-	-	-	-	0.484	**0.042***
	Fructosamine	-	-	-	-	−0.461	**0.027***	-	-
WHtR	HOMA-IR	0.656	**<0.001***	0.500	**0.015***	0.592	**0.003***	0.507	**0.016***
	QUICKI	−0.662	**<0.001***	−0.469	**0.024***	−0.623	**0.002***	−0.497	**0.018***
	FBG	0.611	**0.002***	0.457	**0.028***	0.539	**0.008***	0.491	**0.020***
	Insulin	0.649	**<0.001***	0.424	**0.044***	0.537	**0.008***	0.452	**0.035***
	Fructosamine	-	-	−0.471	**0.023***	−0.719	**<0.001***	−0.621	**0.002***
	SIRT1	-	-	-	-	-	-	0.442	**0.041***
HOMA-IR	Adiponectin	−0.539	**0.008***	-	-	−0.495	**0.016***	-	-
	Fructosamine	-	-	-	-	−0.464	**0.026***	−0.498	**0.016***
QUICKI	Adiponectin	0.516	**0.012***	-	-	0.474	**0.022***	-	-
	Fructosamine	-	-	-	-	0.476	**0.022***	0.474	**0.022***
Insulin	Adiponectin	−0.507	**0.014***	-	-	−0.512	**0.013***	-	-
	Fructosamine	-	-	-	-	-	-	−0.503	**0.014***
FBG	Insulin	0.568	**0.005***	-	-	0.494	**0.016***	0.638	**0.001***

r_p - Spearman's rho; *-statistically significant result results for $p < 0.05$.

draft, Visualization, Validation, Supervision, Software, Resources, Project administration, Methodology, Investigation, Funding acquisition, Formal analysis, Data curation. **Olga Czerwińska-Ledwig:** Writing – review & editing, Visualization, Validation, Software, Resources, Conceptualization. **Roxana Zuziak:** Writing – review & editing, Software, Data curation. **Joanna Kryst:** Writing – review & editing, Resources, Data curation. **Marta Morawiec:** Writing – review & editing, Software, Data curation. **Zbigniew Szygula:** Writing – review & editing, Visualization, Resources, Data curation. **Tomasz Pałka:** Writing – review & editing, Visualization, Methodology, Data curation. **Anna Kurkiewicz-Piotrowska:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Validation, Supervision, Resources, Methodology, Formal analysis, Conceptualization.

Funding

This research was funded by the Academy of Physical Culture in Krakow, grant numbers 165/MN/INP/2023, 314/BS/INP/2023, 317/BS/INP/2023, 318/BS/INP/2023, 322/BS/INP/2023 and 393/BS/INP/2025.

Declaration of interests

None.

References

[1] A.E. Achari, S.K. Jain, Molecular Sciences Adiponectin, a Therapeutic Target for Obesity, Diabetes, and Endothelial Dysfunction, (n.d.).
[2] J.E. Blundell, S. Goodson, J. Halford, Regulation of appetite: role of leptin in signalling systems for drive and satiety, Int. J. Obes. 25 (2001) 29–34.
[3] P. Capodaglio, A. Alito, B.M. Duguè, R. Bouzigon, G. Lombardi, E.D. Miller, F. Verne, G. Modaffari, P. Piterà, E. Ziemann, J.M. Fontana, Contraindications to Whole-Body Cryostimulation (WBC). A position paper from the WBC Working Group of the International Institute of Refrigeration and the multidisciplinary expert panel, Frontiers in Rehabilitation Sciences 6 (2025).
[4] V. Carafa, D. Rotili, M. Forgione, F. Cuomo, E. Serretiello, G.S. Hailu, E. Jarho, M. Lahtela-Kakkonen, A. Mai, L. Altucci, Sirtuin functions and modulation: from chemistry to the clinic, Clin. Epigenet. 8 (2016).
[5] C. Crewe, Y.A. An, P.E. Scherer, The ominous triad of adipose tissue dysfunction: inflammation, fibrosis, and impaired angiogenesis, J. Clin. Investig. 127 (2017) 74–82.
[6] M. Dehghan, F. Farahbod, The efficacy of thermotherapy and cryotherapy on pain relief in patients with acute low back pain, a clinical trial study, J. Clin. Diagn. Res. 8 (2014) LC01–LC04.
[7] A. Dzidek, O. Czerwińska-Ledwig, M. Żychowska, W. Pilch, A. Piotrowska, The role of increased expression of Sirtuin 6 in the prevention of premature aging pathomechanisms, Int. J. Mol. Sci. 24 (2023).
[8] A. Dzidek, A. Piotrowska, The use of cryotherapy in cosmetology and the influence of cryogenic temperatures on selected skin Parameters—A review of the literature, Cosmetics 9 (2022).
[9] A. Dziedzic, K. Maciak, E.D. Miller, M. Starosta, J. Saluk, Targeting vascular impairment, neuroinflammation, and oxidative stress dynamics with whole-body cryotherapy in multiple sclerosis treatment, Int. J. Mol. Sci. 25 (2024).
[10] H. Fang, R.L. Judd, Adiponectin regulation and function, Compr. Physiol. 8 (2018) 1031–1063.
[11] D.M. Fayyad, N. Abdelsalam, N. Hashem, Cryotherapy: a new paradigm of treatment in endodontics, J. Endod. 46 (2020) 936–942.
[12] Q. Feng, J. Be Sevi C, M. Conroy, W. Omiyale, M. Woodward, B. Lacey, N. Allen, Waist-to-height ratio and body fat percentage as risk factors for ischemic cardiovascular disease: a prospective cohort study from UK Biobank, Am. J. Clin. Nutr. 119 (2024) 1386–1396.
[13] J.M. Fontana, S. Bozgeyik, M. Gobbi, P. Piterà, E.M. Giusti, B. Dugué, G. Lombardi, P. Capodaglio, Whole-body cryostimulation in obesity. A scoping review, J. Therm. Biol. 106 (2022).
[14] J.M. Friedman, J.L. Halaas, Leptin and the Regulation of Body Weight in Mammals, 1998.
[15] Z. Frydzińska, A. Owczarek, K. Winiarska, Sirtuiny i ich rola w regulacji metabolizmu, Postepy Biochem. 65 (2019) 31–40.
[16] X. Gu, L. Wang, S. Liu, T. Shan, Adipose tissue adipokines and lipokines: functions and regulatory mechanism in skeletal muscle development and homeostasis, Metabolism 139 (2023).
[17] M.C. Haigis, D.A. Sinclair, Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance, Annu. Rev. Pathol. 5 (2010) 253–295.
[18] A.G. Izquierdo, A.B. Crujeiras, F.F. Casanueva, M.C. Carreira, Leptin, obesity, and leptin resistance: where are we 25 years later? Nutrients 11 (2019).

[19] A. Katz, S.S. Nambi, K. Mather, A.D. Baron, D.A. Follmann, G. Sullivan, M.J. Quon, Quantitative Insulin Sensitivity Check Index: a Simple, Accurate Method for Assessing Insulin Sensitivity in Humans, 2000.
[20] P. Klemm, J. Becker, I. Aykara, T. Asendorf, G. Dischereit, E. Neumann, U. Müller-Ladner, U. Lange, Serial whole-body cryotherapy in fibromyalgia is effective and alters cytokine profiles, Advances in Rheumatology 61 (2021).
[21] M. Kozłowska, J. Kortas, M. Żychowska, J. Antosiewicz, K. Żuczek, S. Perego, G. Lombardi, E. Ziemann, Beneficial effects of whole-body cryotherapy on glucose homeostasis and amino acid profile are associated with a reduced myostatin serum concentration, Sci. Rep. | 11 (123AD) 7097.
[22] Z. Lin, H. Tian, K.S.L. Lam, S. Lin, R.C.L. Hoo, M. Konishi, N. Itoh, Y. Wang, S. R. Bornstein, A. Xu, X. Li, Adiponectin mediates the metabolic effects of FGF21 on glucose homeostasis and insulin sensitivity in mice, Cell Metab. 17 (2013) 779–789.
[23] A. Lubkowska, W. Dudzińska, I. Bryczkowska, B. Dołęgowska, Body composition, lipid profile, adipokine concentration, and antioxidant capacity changes during interventions to treat overweight with exercise Programme and whole-body cryostimulation, Oxid. Med. Cell. Longev. 4 (2015).
[24] D.R. Matthews, J.R. Hosker, A.S. Rudenski, B.A. Naylor, D.F. Treacher, R.C. Turner, Homeostasis Model Assessment: Insulin Resistance and fl-cell Function from Fasting Plasma Glucose and Insulin Concentrations in Man, 1985.
[25] L.P.C. Mayoral, G.M. Andrade, E.P.C. Mayoral, T.H. Huerta, S.P. Canseco, F. J. Rodal Canales, H.A. Cabrera-Fuentes, M.M. Cruz, A.D. Pérez Santiago, J. J. Alpuche, E. Zenteno, H.M. Rufz, R.M. Cruz, J.H. Jeronimo, E. Perez-Campos, Obesity subtypes, related biomarkers & heterogeneity, Indian J. Med. Res. 151 (2020) 11–21.
[26] M. Nishida, T. Moriyama, Y. Sugita, K. Yamauchi-Takihara, Cardiovascular Diabetology Abdominal Obesity Exhibits Distinct Effect on Inflammatory and Anti-inflammatory Proteins in Apparently Healthy Japanese Men, 2007.
[27] G. Ntaios, N.K. Gatselis, K. Makaritsis, G.N. Dalekos, Adipokines as mediators of endothelial function and atherosclerosis, Atherosclerosis 227 (2013) 216–221.
[28] M. Obradovic, E. Sudar-Milovanovic, S. Soskic, M. Essack, S. Arya, A.J. Stewart, T. Gojobori, E.R. Isenovic, Leptin and obesity: role and clinical implication, Front. Endocrinol. 12 (2021).
[29] N. Ouchi, J.L. Parker, J.J. Lugus, K. Walsh, Adipokines in inflammation and metabolic disease, Nat. Rev. Immunol. 11 (2011) 85–97.
[30] N. Perakakis, O.M. Farr, C.S. Mantzoros, Leptin in leanness and obesity: JACC state-of-the-art review, J. Am. Coll. Cardiol. 77 (2021) 745–760.
[31] W. Pilch, A. Piotrowska, J. Wyrostek, O. Czerwińska-Ledwig, E. Ziemann, J. Antosiewicz, M. Zasada, M. Kuless-Mrowiecka, M. Żychowska, Different changes in adipokines, lipid profile, and TNF-Alpha levels between 10 and 20 whole body cryostimulation sessions in individuals with I and II degrees of obesity, Biomedicines 10 (2022).
[32] X. Prieur, M. Cormont, J. Wu, M. Yuan, W. Li, Y. Zhu, B. Yu, Asprosin: a novel player in metabolic diseases, Front. Endocrinol. 11 (2020) 64. Www.Frontiersin.Org.
[33] B. Ptaszek, S. Podsiadło, A. Wójcik, O. Czerwińska-Ledwig, A. Teległów, The influence of whole-body cryotherapy or winter swimming on the lipid profile and selected adipokines, BMC Sports Sci. Med. Rehabil. 15 (2023).
[34] B. Ptaszek, S. Podsiadło, A. Wójcik, O. Czerwińska-Lewig, A. Teległów, The influence of whole-body cryotherapy or winter swimming on the lipid profile and selected adipokines, BMC Sports Sci. Med. Rehabil. (2023) 135.
[35] K. Rådholm, J. Chalmers, T. Ohkuma, S. Peters, N. Poulter, P. Hamet, S. Harrap, M. Woodward, Use of the waist-to-height ratio to predict cardiovascular risk in patients with diabetes: results from the ADVANCE-ON study, Diabetes Obes. Metabol. 20 (2018) 1903–1910.
[36] A.R. Resources, Asprosin, a fasting-induced glucogenic protein hormone HHS public access, J. Cell. 165 (2016) 566–579.
[37] N.H. Rogers, M.S. Obin, A.S. Greenberg, Obesity and adipokines, in: Treatment of the Obese Patient, Humana Press, 2007, pp. 69–85.
[38] J.M. Rutkowski, K.E. Davis, P.E. Scherer, Mechanisms of obesity and related pathologies: the macro- and microcirculation of adipose tissue, FEBS J. 276 (2009) 5738–5746.
[39] J.E. Rymaszewska, B. Stańczykiewicz, K. Lion, B. Misiak, The impact of whole-body cryotherapy on lipid profile: a systematic review and meta-analysis, Compl. Ther. Med. 55 (2020).
[40] T. Sadura-Sieklucka, B. Solitysiuk, A. Karlicka, B. Sokołowska, E. Kontny, K. Księzopolska-Orłowska, Effects of whole body cryotherapy in patients with rheumatoid arthritis considering immune parameters, Reumatologia 57 (2019) 320–325.
[41] A. Sieron, G. Cieslar, A. Stanek, Cryotherapy: theoretical bases, biological effects. Clinical Applications, α-Medica. Press, Poland, Bielsko-Biała, 2010.
[42] K. Skoracka, S. Hryhorowicz, P. Schulz, A. Zawada, A.E. Ratajczak-Pawłowska, A. M. Rychter, R. Słomski, A. Dobrowolska, I. Krela-Kaźmierczak, The role of leptin and ghrelin in the regulation of appetite in obesity, Peptides (N.Y.). (2025) 186.
[43] B. Skowrońska, M. Fichna, P. Fichna, Rola tkanki tłuszczowej w układzie dokrewnym, Endokrynologia, Otyłość i Zaburzenia Przemiany Materii 1 (2005) 21–29.
[44] A. Stanek, A. Cholewka, J. Gadula, Z. Drzazga, A. Sieron, K. Sieron-Stoltny, Can whole-body cryotherapy with subsequent kinesiotherapy procedures in closed type cryogenic chamber improve BASDAI, BASFI, and some spine mobility parameters and decrease pain intensity in patients with ankylosing spondylitis? BioMed Res. Int. 2015 (2015).
[45] Q. Tang, Y. Gao, Q. Liu, X. Yang, T. Wu, C. Huang, Y. Huang, J. Zhang, Z. Zhang, R. Li, S. Pu, G. Zhang, Y. Zhao, J. Zhou, H. Huang, Y. Li, W. Jiang, Y. Chang, J. He, Sirt6 in pro-opiomelanocortin neurons controls energy metabolism by modulating leptin signaling, Mol. Metabol. 37 (2020).
[46] J. Webber, Energy balance in obesity, Proc. Nutr. Soc. 62 (2003) 539–543.
[47] C. Weir, A. Jan, BMI Classificatioon Percentile and Cut off Points, StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2023.
[48] S. Wharton, D.C.W. Lau, M. Vallis, A.M. Sharma, L. Biertho, D. Campbell-Scherer, K. Adamo, A. Alberga, R. Bell, N. Boulé, E. Boyling, J. Brown, B. Calam, C. Clarke, L. Crowshoe, D. Divalentino, M. Forhan, Y. Freedhoff, M. Gagner, S. Glazer, C. Grand, M. Green, M. Hahn, R. Hawa, R. Henderson, D. Hong, P. Hung, L Janssen, K. Jacklin, C. Johnson-Stoklossa, A. Kemp, S. Kirk, J. Kuk, M.F. Langlois, S. Lear, A. McInnes, D. Macklin, L. Naji, P. Manjoo, M.P. Morin, K. Nerenberg, I. Patton, S. Pedersen, L. Pereira, H. Piccinini-Vallis, M. Poddar, P. Poirier, D. Prud'homme, X. Ramos Salas, C. Rueda-Clausen, S. Russell-Mayhew, J. Shiau, D. Sherifali, J. Sievenpiper, S. Sockalingam, V. Taylor, E. Toth, L. Twells, R. Tytus, S. Walji, L. Walker, S. Wicklum, Obesity in adults: a clinical practice guideline, CMAJ (Can. Med. Assoc. J.) 192 (2020) E875–E891.
[49] M. Wiecek, J. Szymura, J. Kusmierczyk, M. Lipowska, Z. Szygula, Whole-Body cryotherapy improves asprosin secretion and insulin sensitivity, in: Postmenopausal Women-Perspectives in the Management of Type 2 Diabetes, 2023.
[50] M. Wiecek, J. Szymura, J. Sproull, Z. Szygula, Clinical Medicine Decreased Blood Asprosin in Hyperglycemic Menopausal Women as a Result of Whole-Body Cryotherapy Regardless of Metabolic Syndrome, 2019.
[51] M. Wiecek, J. Szymura, J. Sproull, Z. Szygula, Decreased blood asprosin in hyperglycemic menopausal women as a result of whole-body cryotherapy regardless of metabolic syndrome, J. Clin. Med. 8 (2019).
[52] M. Wiecek, J. Szymura, J. Sproull, Z. Szygula, Whole-body cryotherapy is an effective method of reducing abdominal obesity in menopausal women with metabolic syndrome, J. Clin. Med. 9 (2020) 1–21.
[53] A. Van De Winckel, E. Hohenauer, S.M. Carmignano, P. Capodaglio, A. Alito, B. M. Duguè, R. Bouzigon, G. Lombardi, E. Dorota Miller, F. Verme, G. Modaffari, P. Piterà, E. Ziemann, J.M. Fontana, Contraindications to Whole-Body Cryostimulation (WBC), A Position Paper from the WBC Working Group of the International Institute of Refrigeration and the Multidisciplinary Expert Panel, 2025.
[54] A. Van De Winckel, E. Hohenauer, S.M. Carmignano, P. Capodaglio, A. Alito, B. M. Duguè, R. Bouzigon, G. Lombardi, E. Dorota Miller, F. Verme, G. Modaffari, P. Piterà, E. Ziemann, J.M. Fontana, Contraindications to Whole-Body Cryostimulation (WBC), A Position Paper from the WBC Working Group of the International Institute of Refrigeration and the Multidisciplinary Expert Panel, 2025.
[55] G. Wojciak, J. Szymura, Z. Szygula, J. Gradek, M. Wiecek, The effect of repeated whole-body cryotherapy on SIRT1 and SIRT3 concentrations and oxidative status in older and young men performing different levels of physical activity, Antioxidants 10 (2021) 1–16.
[56] H. Yanai, H. Yoshida, Molecular Sciences Beneficial Effects of Adiponectin on Glucose and Lipid Metabolism and Atherosclerotic Progression: Mechanisms and Perspectives, 2019.
[57] Y. Yang, Y. Liu, Y. Wang, Y. Chao, J. Zhang, Y. Jia, J. Tie, D. Hu, Regulation of SIRT1 and Its Roles in Inflammation, (n.d.).
[58] F. Yiannikouris, M. Gupte, K. Putnam, L. Cassis, Adipokines and blood pressure control, Curr. Opin. Nephrol. Hypertens. 19 (2010) 195–200.
[59] S. Zhang, X. Fu, Z. Du, X. Guo, Z. Li, G. Sun, Y. Zhou, H. Yang, S. Yu, L. Zheng, Y. Sun, X. Zhang, Relation Between Quantity and Quality of peri-coronary Epicardial Adipose Tissue and its Underlying Hemodynamically Significant Coronary Stenosis, 2020.
[60] E. Ziemann, R.A. Olek, T. Grzywacz, J. Antosiewicz, S. Kujach, M. Łuszczyk, M. Smaruj, E. Śledziewska, R. Laskowski, Whole-body cryostimulation as an effective method of reducing low-grade inflammation in obese men, J. Physiol. Sci. 63 (2013) 333–343.
[61] https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight.
[62] https://cdn.who.int/media/docs/default-source/ncds/ncd-surveillance/steps/part3-section5.pdf?sfvrsn=a46653c7_2.

Oświadczenia autorów

Kraków, 07.01.2026

mgr Adrianna Dzidek

Szkoła Doktorska Nauk o Kulturze Fizycznej

Wydział Rehabilitacji Ruchowej

Akademia Kultury Fizycznej

Im. Bronisława Czecha w Krakowie

Oświadczenie pierwszego autora

Mój udział w przygotowaniu publikacji pod tytułem: „*The Use of Cryotherapy in Cosmetology and the Influence of Cryogenic Temperatures on Selected Skin Parameters—A Review of the Literature*", Cosmetics, 2022, 9, 100; https://doi.org/10.3390/ cosmetics9050100 obejmował:

- Przeszukiwanie baz danych w celu wyselekcjonowania odpowiednich pozycji;
- Przygotowanie bazy danych;
- Przygotowanie pierwowzoru tekstu;
- Walidację i wizualizację tekstu;
- Redagowanie i edycję tekstu.

Oświadczam, że mój udział wkładu pracy w powstanie artykułu wyniósł 55%.

Podpis

Adrianna Dzidek

Kraków, 07.01.2026

dr hab. Anna Kurkiewicz-Piotrowska, prof. AWF

Zakład Chemii i Biochemii

Wydział Rehabilitacji Ruchowej

Akademia Kultury Fizycznej

Im. Bronisława Czecha w Krakowie

Oświadczenie współautora

Mój udział w przygotowaniu publikacji pod tytułem: *„The Use of Cryotherapy in Cosmetology and the Influence of Cryogenic Temperatures on Selected Skin Parameters—A Review of the Literature"*, Cosmetics, 2022, 9, 100; https://doi.org/10.3390/ cosmetics9050100 obejmował:

- Przygotowanie koncepcji artykułu przeglądowego;
- Opracowanie metodologii;
- Sprawdzenie wyszukanych pozycji literaturowych;
- Pomoc w przygotowaniu pierwowzoru tekstu;
- Walidację tekstu;
- Redagowanie i edycję tekstu;
- Nadzór i administrację projektu.

Oświadczam, że mój udział wkładu pracy w powstanie artykułu wyniósł 45%.

Podpis

Kraków, 07.01.2026

mgr Adrianna Dzidek

Szkoła Doktorska Nauk o Kulturze Fizycznej

Wydział Rehabilitacji Ruchowej

Akademia Kultury Fizycznej

Im. Bronisława Czecha w Krakowie

Oświadczenie pierwszego autora

Mój udział w przygotowaniu publikacji pod tytułem: Mój udział w przygotowaniu publikacji pod tytułem: „ *The Role of Increased Expression of Sirtuin 6 in the Prevention of Premature Aging Pathomechanisms",* Int J Mol Sci. 2023;24(11):9655. doi: 10.3390/ijms24119655; obejmował:

- Koncepcję badań;
- Przeszukiwanie baz danych w celu wyselekcjonowania odpowiednich pozycji;
- Przygotowanie bazy danych;
- Przygotowanie pierwowzoru tekstu;
- Wizualizację tekstu.

Oświadczam, że mój udział wkładu pracy w powstanie artykułu wyniósł 51%.

Podpis

Adrianna Dzidek

Kraków, 07.01.2026

dr Olga Czerwińska-Ledwig

Zakład Chemii i Biochemii

Wydział Rehabilitacji Ruchowej

Akademia Kultury Fizycznej

im. Bronisława Czecha w Krakowie

Oświadczenie współautora

Mój udział w przygotowaniu publikacji pod tytułem: „ *The Role of Increased Expression of Sirtuin 6 in the Prevention of Premature Aging Pathomechanisms"* Int J Mol Sci. 2023;24(11):9655. doi: 10.3390/ijms24119655; obejmował:

- Walidację tekstu;

- Redagowanie i edycję tekstu;

- Administrację projektu.

Oświadczam, że mój udział wkładu pracy w powstanie artykułu wyniósł 10%.

Podpis

Kraków, 07.01.2026

dr hab. Anna Kurkiewicz-Piotrowska, prof. AWF

Zakład Chemii i Biochemii

Wydział Rehabilitacji Ruchowej

Akademia Kultury Fizycznej

im. Bronisława Czecha w Krakowie

Oświadczenie współautora

Mój udział w przygotowaniu publikacji pod tytułem: „ *The Role of Increased Expression of Sirtuin 6 in the Prevention of Premature Aging Pathomechanisms"* Int J Mol Sci. 2023;24(11):9655. doi: 10.3390/ijms24119655; obejmował:

- Przygotowanie koncepcji badań;
- Opracowanie metodologii badań;
- Walidację tekstu;
- Redagowanie i edycję tekstu;
- Pozyskiwanie funduszy.

Oświadczam, że mój udział wkładu pracy w powstanie artykułu wyniósł 24%.

Podpis

Kraków, 07.01.2026

mgr Adrianna Dzidek

Szkoła Doktorska Nauk o Kulturze Fizycznej

Wydział Rehabilitacji Ruchowej

Akademia Kultury Fizycznej

Im. Bronisława Czecha w Krakowie

Oświadczenie pierwszego autora

Mój udział w przygotowaniu publikacji pod tytułem: *Leptyna w otyłości - możliwości terapeutyczne*. In book: Fizjoterapia i aktywność fizyczna jako podstawy zdrowia człowieka Tom 1; Wydawnictwo Naukowe TYGIEL, Lublin. Wrzesień 2024, 36-45, obejmował:

- Przeszukiwanie baz danych w celu wyselekcjonowania odpowiednich pozycji;
- Przygotowanie bazy danych;
- Przygotowanie pierwowzoru tekstu;
- Walidację i wizualizację tekstu;
- Redagowanie i edycję tekstu.

Oświadczam, że mój udział wkładu pracy w powstanie artykułu wyniósł 55%.

Podpis

Adrianna Dzidek

Kraków, 07.01.2026

dr hab. Anna Kurkiewicz-Piotrowska, prof. AWF

Zakład Chemii i Biochemii

Wydział Rehabilitacji Ruchowej

Akademia Kultury Fizycznej

Im. Bronisława Czecha w Krakowie

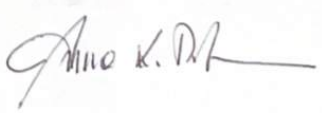
Oświadczenie współautora

Mój udział w przygotowaniu publikacji pod tytułem: *Leptyna w otyłości - możliwości terapeutyczne*. In book: Fizjoterapia i aktywność fizyczna jako podstawy zdrowia człowieka Tom 1; Wydawnictwo Naukowe TYGIEL, Lublin. Wrzesień 2024, 36-45 obejmował:

- Przygotowanie koncepcji artykułu przeglądowego;
- Opracowanie metodologii;
- Sprawdzenie wyszukanych pozycji literaturowych;
- Pomoc w przygotowaniu pierwowzoru tekstu;
- Walidację tekstu;
- Redagowanie i edycję tekstu;
- Nadzór i administrację projektu.

Oświadczam, że mój udział wkładu pracy w powstanie artykułu wyniósł 45%.

Podpis



Kraków, 07.01.2026

mgr Adrianna Dzidek

Szkoła Doktorska Nauk o Kulturze Fizycznej

Wydział Rehabilitacji Ruchowej

Akademia Kultury Fizycznej

Im. Bronisława Czecha w Krakowie

Oświadczenie pierwszego autora

Mój udział w przygotowaniu publikacji pod tytułem: *„Use of Measurement Probes to Evaluate the Effect of a Series of Whole-Body Cryostimulation Treatments on Skin Characteristics in Subjects with Different BMIs"*, Applied Sciences, 2025, 15, 2897; doi: 10.3390/app15062897; obejmował:

- Koncepcję badań;
- Opracowanie metodologii badań;
- Formalną analizę badań;
- Przeprowadzenie badań;
- Zbieranie i opracowanie wyników;
- Przygotowanie pierwowzoru tekstu;
- Walidację i wizualizację tekstu;
- Redagowanie i edycję tekstu;
- Nadzór nad projektem;
- Pozyskiwanie funduszy.

Oświadczam, że mój udział wkładu pracy w powstanie artykułu wyniósł 51%.

Podpis

Adrianna Dzidek

Kraków, 07.01.2026

dr Olga Czerwińska-Ledwig

Zakład Chemii i Biochemii

Wydział Rehabilitacji Ruchowej

Akademia Kultury Fizycznej

im. Bronisława Czecha w Krakowie

Oświadczenie współautora

Mój udział w przygotowaniu publikacji pod tytułem: *„Use of Measurement Probes to Evaluate the Effect of a Series of Whole-Body Cryostimulation Treatments on Skin Characteristics in Subjects with Different BMIs"*, Applied Sciences, 2025, 15, 2897; doi: 10.3390/app15062897; obejmował:

- Pomoc w opracowaniu wyników;
- Pomoc przy wizualizacji i walidacji tekstu;
- Redagowanie i edycję tekstu.

Oświadczam, że mój udział wkładu pracy w powstanie artykułu wyniósł 12%.

Podpis

Tarnów, 09.01.2026

Agata Szlachetka

Zakład Kosmetologii

Wydział Lekarski i Nauk o Zdrowiu

Akademia Tarnowska

Oświadczenie współautora

Mój udział w przygotowaniu publikacji pod tytułem: *„Use of Measurement Probes to Evaluate the Effect of a Series of Whole-Body Cryostimulation Treatments on Skin Characteristics in Subjects with Different BMIs"*, Applied Sciences, 2025, 15, 2897; doi: 10.3390/app15062897; obejmował:

- Pomoc w opracowaniu metodologii badań;
- Pomoc przy przygotowaniu bazy danych;
- Pomoc przy wizualizacji tekstu;
- Redagowanie i edycja tekstu.

Oświadczam, że mój udział wkładu pracy w powstanie artykułu wyniósł 5%.

Podpis

Agata Szlachetka

Poznań, 09.01.2026

prof. dr hab. Ewa Ziemann

Zakład Lekkiej Atletyki i Przygotowania Motorycznego

Wydział Lekarski i Nauk o Zdrowiu

Akademia Wychowania Fizycznego,

im. Eugeniusza Piaseckiego w Poznaniu

Oświadczenie współautora

Mój udział w przygotowaniu publikacji pod tytułem: *„Use of Measurement Probes to Evaluate the Effect of a Series of Whole-Body Cryostimulation Treatments on Skin Characteristics in Subjects with Different BMIs"*, Applied Sciences, 2025, 15, 2897; doi: 10.3390/app15062897; obejmował:

- Pomoc w opracowaniu metodologii badań;
- Pomoc przy wizualizacji tekstu;
- Redagowanie i edycję tekstu;
- Nadzorowanie projektu.

Oświadczam, że mój udział wkładu pracy w powstanie artykułu wyniósł 5%.

Podpis

Podpisano przez/ Signed by:
Ewa
Ziemann
Data/ Date: 27.01.2026 09:09
mSzafir

Lublin, 09.01.2026 r.

dr n. med. i n. o zdr. Dorota Kasprzak

Wydział Nauk o Zdrowiu

Akademia Nauk Stosowanych

Wincentego Pola w Lublinie

Oświadczenie współautora

Mój udział w przygotowaniu publikacji pod tytułem: *„Use of Measurement Probes to Evaluate the Effect of a Series of Whole-Body Cryostimulation Treatments on Skin Characteristics in Subjects with Different BMIs"*, Applied Sciences, 2025, 15, 2897; doi: 10.3390/app15062897; obejmował:

- Pomoc w przygotowywaniu zgromadzonych danych;
- Pomoc przy wizualizacji tekstu;
- Redagowanie i edycję tekstu;

Oświadczam, że mój udział wkładu pracy w powstanie artykułu wyniósł 5%.

Podpis

Dorota Kasprzak

Bydgoszcz, 09.01.2026

dr hab. Mariusz Zasada

Katedra Indywidualnych i Zespołowych Aktywności Fizycznych

Wydział Nauk o Zdrowiu i Kulturze Fizycznej

Uniwersytet Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy

Oświadczenie współautora

Mój udział w przygotowaniu publikacji pod tytułem: *„Use of Measurement Probes to Evaluate the Effect of a Series of Whole-Body Cryostimulation Treatments on Skin Characteristics in Subjects with Different BMIs"*, Applied Sciences, 2025, 15, 2897; doi: 10.3390/app15062897; obejmował:

- Pomoc w opracowaniu metodologii badań;
- Pomoc przy wizualizacji tekstu;
- Redagowanie i edycję tekstu;
- Nadzór projektu.

Oświadczam, że mój udział wkładu pracy w powstanie artykułu wyniósł 5%.

Kraków, 07.01.2026

dr hab. Anna Kurkiewicz-Piotrowska, prof. AWF

Zakład Chemii i Biochemii

Wydział Rehabilitacji Ruchowej

Akademia Kultury Fizycznej

im. Bronisława Czecha w Krakowie

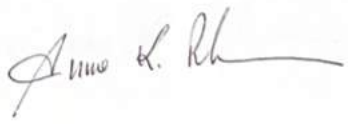
Oświadczenie współautora

Mój udział w przygotowaniu publikacji pod tytułem: *„Use of Measurement Probes to Evaluate the Effect of a Series of Whole-Body Cryostimulation Treatments on Skin Characteristics in Subjects with Different BMIs"*, Applied Sciences, 2025, 15, 2897; doi: 10.3390/app15062897; obejmował:

- Przygotowanie koncepcji badań;
- Opracowanie metodologii badań;
- Analizę formalną;
- Pomoc w przygotowaniu pierwowzoru tekstu;
- Pomoc przy wizualizacji i walidacji tekstu;
- Redagowanie i edycję tekstu;
- Nadzór projektu.

Oświadczam, że mój udział wkładu pracy w powstanie artykułu wyniósł 17%.

Podpis



Kraków, 07.01.2026

mgr Adrianna Dzidek

Szkoła Doktorska Nauk o Kulturze Fizycznej

Wydział Rehabilitacji Ruchowej

Akademia Kultury Fizycznej

Im. Bronisława Czecha w Krakowie

Oświadczenie pierwszego autora

Mój udział w przygotowaniu publikacji pod tytułem: Mój udział w przygotowaniu publikacji pod tytułem: *„Effect of a series of whole-body cryostimulation treatments on vaspin levels in subjects with different body mass indexes”,* Acta Balneol. 2025;67(2):114-120. doi: 10.36740/ABAL202502106; obejmował:

- Koncepcję badań;
- Opracowanie metodologii badań;
- Formalną analizę badań;
- Przeprowadzenie badań;
- Wykonywanie oznaczeń biochemicznych;
- Zbieranie i opracowanie wyników;
- Przygotowanie pierwowzoru tekstu;
- Walidację i wizualizację tekstu;
- Redagowanie i edycję tekstu;
- Nadzór nad projektem;
- Pozyskiwanie funduszy.

Oświadczam, że mój udział wkładu pracy w powstanie artykułu wyniósł 51%.

Adrianna Dzidek

Kraków, 07.01.2026

dr Olga Czerwińska-Ledwig

Zakład Chemii i Biochemii

Wydział Rehabilitacji Ruchowej

Akademia Kultury Fizycznej

im. Bronisława Czecha w Krakowie

Oświadczenie współautora

Mój udział w przygotowaniu publikacji pod tytułem: Mój udział w przygotowaniu publikacji pod tytułem: *„Effect of a series of whole-body cryostimulation treatments on vaspin levels in subjects with different body mass indexes''*, Acta Balneol. 2025;67(2):114-120. doi: 10.36740/ABAL202502106; obejmował:

- Pomoc przy przeprowadzeniu badań;

- Pomoc przy wykonywaniu oznaczeń biochemicznych;

- Pomoc w opracowaniu wyników;

- Redagowanie i edycję tekstu.

Oświadczam, że mój udział wkładu pracy w powstanie artykułu wyniósł 12%.

Podpis

Kraków, 07.01.2026

dr Roxana Zuziak

Zakład Chemii i Biochemii

Wydział Rehabilitacji Ruchowej

Akademia Kultury Fizycznej

im. Bronisława Czecha w Krakowie

Oświadczenie współautora

Mój udział w przygotowaniu publikacji pod tytułem: Mój udział w przygotowaniu publikacji pod tytułem: *„Effect of a series of whole-body cryostimulation treatments on vaspin levels in subjects with different body mass indexes''*, Acta Balneol. 2025;67(2):114-120. doi: 10.36740/ABAL202502106; obejmował:

- Pomoc przy wykonywaniu oznaczeń biochemicznych;

- Redagowanie i edycję tekstu.

Oświadczam, że mój udział wkładu pracy w powstanie artykułu wyniósł 5%.

Podpis

R. Zuziak

Kraków, 07.01.2026

dr Joanna Kryst

Zakład Chemii i Biochemii

Wydział Rehabilitacji Ruchowej

Akademia Kultury Fizycznej

im. Bronisława Czecha w Krakowie

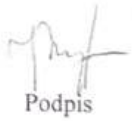
Oświadczenie współautora

Mój udział w przygotowaniu publikacji pod tytułem: Mój udział w przygotowaniu publikacji pod tytułem: *„Effect of a series of whole-body cryostimulation treatments on vaspin levels in subjects with different body mass indexes''*, Acta Balneol. 2025;67(2):114-120. doi: 10.36740/ABAL202502106; obejmował:

- Pomoc przy wykonywaniu oznaczeń biochemicznych;

- Redagowanie i edycję tekstu.

Oświadczam, że mój udział wkładu pracy w powstanie artykułu wyniósł 5%.



Podpis

Kraków, 07.01.2026

mgr Marta Morawiec

Zakład Kosmetologii Estetycznej

Wydział Rehabilitacji Ruchowej

Akademia Kultury Fizycznej

im. Bronisława Czecha w Krakowie

Oświadczenie współautora

Mój udział w przygotowaniu publikacji pod tytułem: Mój udział w przygotowaniu publikacji pod tytułem: *„Effect of a series of whole-body cryostimulation treatments on vaspin levels in subjects with different body mass indexes”,* Acta Balneol. 2025;67(2):114-120. doi: 10.36740/ABAL202502106; obejmował:

- Pomoc przy przeprowadzaniu badań;

- Redagowanie i edycję tekstu.

Oświadczam, że mój udział wkładu pracy w powstanie artykułu wyniósł 5%.

Podpis

Kraków, 07.01.2026

dr hab. Anna Kurkiewicz-Piotrowska, prof. AWF

Zakład Chemii i Biochemii

Wydział Rehabilitacji Ruchowej

Akademia Kultury Fizycznej

im. Bronisława Czecha w Krakowie

Oświadczenie współautora

Mój udział w przygotowaniu publikacji pod tytułem: Mój udział w przygotowaniu publikacji pod tytułem: *„Effect of a series of whole-body cryostimulation treatments on vaspin levels in subjects with different body mass indexes''*, Acta Balneol. 2025;67(2):114-120. doi: 10.36740/ABAL202502106; obejmował:

- Przygotowanie koncepcji badań;
- Opracowanie metodologii badań;
- Analizę formalną;
- Pomoc w przeprowadzeniu badań;
- Pomoc w przygotowaniu pierwowzoru tekstu;
- Pomoc przy wizualizacji i walidacji tekstu;
- Redagowanie i edycję tekstu;
- Nadzór projektu.

Oświadczam, że mój udział wkładu pracy w powstanie artykułu wyniósł 22%.

Podpis

Kraków, 02.03.2026

mgr Adrianna Dzidek

Szkoła Doktorska Nauk o Kulturze Fizycznej

Wydział Rehabilitacji Ruchowej

Akademia Kultury Fizycznej

Im. Bronisława Czecha w Krakowie

Oświadczenie pierwszego autora

Mój udział w przygotowaniu publikacji pod tytułem: „*The effect of whole-body cryostimulation treatments on the profile of selected adipokines and sirtuins in middle-aged individuals with varying degrees of body fatness*", Cryobiology, 2026, 122, 105599; https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2026.105599 obejmował:

- Przygotowanie pierwowzoru tekstu;
- Redagowanie i edycję tekstu;
- Walidację i wizualizację tekstu;
- Konceptualizację badań;
- Przygotowanie metodologii badań;
- Pozyskiwanie funduszy;
- Przeprowadzanie badań;
- Administrację projektu;
- Nadzór nad projektem;
- Gromadzenie danych;
- Analizę formalną i statystyczną.

Oświadczam, że mój udział wkładu pracy w powstanie artykułu wyniósł 55 %.

Podpis

Adrianna Dzidek

Kraków, 03.03.2026

dr Olga Czerwińska-Ledwig

Zakład Chemii i Biochemii

Wydział Rehabilitacji Ruchowej

Akademia Kultury Fizycznej

im. Bronisława Czecha w Krakowie

Oświadczenie współautora

Mój udział w przygotowaniu publikacji pod tytułem: „*The effect of whole-body cryostimulation treatments on the profile of selected adipokines and sirtuins in middle-aged individuals with varying degrees of body fatness*", Cryobiology, 2026, 122, 105599; https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2026.105599 obejmował:

- Redagowanie i edycję tekstu;
- Walidację i wizualizację tekstu;
- Pomoc w konceptualizacji badań;
- Pomoc w przeprowadzeniu oznaczeń biochemicznych;
- Pomoc przy analizie statystycznej.

Oświadczam, że mój udział wkładu pracy w powstanie artykułu wyniósł 8%.

Podpis

Kraków, 03.03.2026

dr Roxana Zuziak

Zakład Chemii i Biochemii

Wydział Rehabilitacji Ruchowej

Akademia Kultury Fizycznej

im. Bronisława Czecha w Krakowie

Oświadczenie współautora

Mój udział w przygotowaniu publikacji pod tytułem: *„The effect of whole-body cryostimulation treatments on the profile of selected adipokines and sirtuins in middle-aged individuals with varying degrees of body fatness"*, Cryobiology, 2026, 122, 105599; https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2026.105599 obejmował:

- Redagowanie i edycję tekstu;
- Pomoc przy analizie statystycznej;
- Pomoc w gromadzeniu i porządkowaniu danych.

Oświadczam, że mój udział wkładu pracy w powstanie artykułu wyniósł 5%.

R. Zuziak

Podpis

Kraków, 03.03.2026

dr Joanna Kryst

Zakład Chemii i Biochemii

Wydział Rehabilitacji Ruchowej

Akademia Kultury Fizycznej

im. Bronisława Czecha w Krakowie

Oświadczenie współautora

Mój udział w przygotowaniu publikacji pod tytułem: „*The effect of whole-body cryostimulation treatments on the profile of selected adipokines and sirtuins in middle-aged individuals with varying degrees of body fatness*", Cryobiology, 2026, 122, 105599; https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2026.105599 obejmował:

- Pomoc przy wykonywaniu oznaczeń biochemicznych;
- Redagowanie i edycję tekstu;
- Pomoc przy gromadzeniu i porządkowaniu danych.

Oświadczam, że mój udział wkładu pracy w powstanie artykułu wyniósł 5%.

Podpis

Kraków, 07.01.2026

mgr Marta Morawiec

Zakład Kosmetologii Estetycznej

Wydział Rehabilitacji Ruchowej

Akademia Kultury Fizycznej

im. Bronisława Czecha w Krakowie

Oświadczenie współautora

Mój udział w przygotowaniu publikacji pod tytułem: Mój udział w przygotowaniu publikacji pod tytułem: *„Effect of a series of whole-body cryostimulation treatments on vaspin levels in subjects with different body mass indexes''*, Acta Balneol. 2025;67(2):114-120. doi: 10.36740/ABAL202502106; obejmował:

- Pomoc przy przeprowadzaniu badań;

- Redagowanie i edycję tekstu.

Oświadczam, że mój udział wkładu pracy w powstanie artykułu wyniósł 5%.

Podpis

Kraków, 03.04.2026

prof. dr hab. Zbigniew Szyguła

Zakład Medycyny Sportowej i Żywienia Człowieka

Wydział Wychowania Fizycznego i Sportu

Akademia Kultury Fizycznej

im. Bronisława Czecha w Krakowie

Oświadczenie współautora

Mój udział w przygotowaniu publikacji pod tytułem: *„The effect of whole-body cryostimulation treatments on the profile of selected adipokines and sirtuins in middle-aged individuals with varying degrees of body fatness"*, Cryobiology, 2026, 122, 105599; https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2026.105599 obejmował:

- Redagowanie i edycję tekstu;
- Wizualizację tekstu;
- Pomoc w przeprowadzeniu badań;
- Pomoc przy kuracji danych.

Oświadczam, że mój udział wkładu pracy w powstanie artykułu wyniósł 4%.

Podpis

Kraków, 03.03.2026

prof. dr hab. Tomasz Pałka,

Zakład Fizjologii i Biochemii

Wydział Wychowania Fizycznego i Sportu

Akademia Kultury Fizycznej

Im. Bronisława Czecha w Krakowie

Oświadczenie współautora

Mój udział w przygotowaniu publikacji pod tytułem: „*The effect of whole-body cryostimulation treatments on the profile of selected adipokines and sirtuins in middle-aged individuals with varying degrees of body fatness*", Cryobiology, 2026, 122, 105599; https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2026.105599 obejmował:

- Redagowanie i edycję tekstu;
- Wizualizację tekstu;
- Pomoc w opracowaniu metodologii badań;
- Pomoc przy kuracji danych.

Oświadczam, że mój udział wkładu pracy w powstanie artykułu wyniósł 3%.

Podpis

Kraków, 02.03.2026

dr hab. Anna Kurkiewicz-Piotrowska, prof. AKF

Zakład Chemii i Biochemii

Wydział Rehabilitacji Ruchowej

Akademia Kultury Fizycznej

Im. Bronisława Czecha w Krakowie

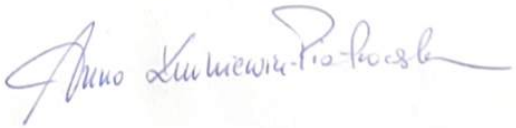
Oświadczenie współautora

Mój udział w przygotowaniu publikacji pod tytułem: *„The effect of whole-body cryostimulation treatments on the profile of selected adipokines and sirtuins in middle-aged individuals with varying degrees of body fatness"*, Cryobiology, 2026, 122, 105599; https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2026.105599 obejmował:

- Przygotowanie pierwowzoru tekstu;
- Redagowanie i edycję tekstu;
- Walidację i wizualizację tekstu;
- Pomoc przy konceptualizacji badań;
- Pomoc w przygotowaniu metodologii badań;
- Pomoc w przeprowadzaniu badań;
- Nadzór nad projektem;
- Analizę formalną.

Oświadczam, że mój udział wkładu pracy w powstanie artykułu wyniósł 15%.

Podpis



Zgoda Komisji Bioetycznej

Komisja Bioetyczna
przy Okręgowej Izbie Lekarskiej
w Krakowie

Nr 177 /KBL/OIL/2023 z dnia 25 września 2023 r.

Na posiedzeniu w dniu 25 września 2023 r. Komisja zapoznała się z wnioskiem (dokumentacja w załączeniu) złożonym przez :

Koordynator Badania: mgr Adrianna Dzidek
Akademia Wychowania Fizycznego im. B. Czecha, Al. Jana Pawła II 78, 31-571 Kraków

Tytuł badania: Wpływ zabiegów krioterapii ogólnoustrojowej na wybrane cech skóry oraz profil wybranych adipokin i sirtuin w osób w średnim wieku z różnym stopniem otłuszczenia organizmu.

Do wniosku dołączono:

- Wniosek w sprawie wyrażenia zgody na przeprowadzenie eksperymentu medycznego
- Protokół badania
- Streszczenie protokołu
- Życiorys głównego badacza
- Informacja dla Pacjenta
- Formularz Świadomej Zgody Pacjenta z klauzulą o „Ochronie Danych Osobowych"
- Kserokopia polisy ubezpieczeniowej OC lekarza nadzorującego badanie
- Kserokopia polisy ubezpieczeniowej Ośrodka, w którym będzie realizowane badanie
- Lista ośrodków Biorących Udział w Badaniu

Komisja wyraża zgodę na przeprowadzenia badania na warunkach przedstawionych we wniosku.
Zgoda Komisji dla Ośrodka jest ważna do dnia ważności Polisy Ubezpieczeniowej
Skład i działanie Komisji zgodne z zasadami Dobrej Praktyki Klinicznej (GCP) oraz wymogami lokalnymi
Lista członków Komisji biorących udział w posiedzeniu stanowi załącznik do niniejszego dokumentu.
Pouczenie: W ciągu 14 dni od otrzymania niniejszej opinii Wnioskodawcy przysługuje prawo odwołania do Komisji Odwoławczej za pośrednictwem Komisji Bioetycznej przy OIL w Krakowie

Kraków, dnia 09.10.2023 r.

Przewodniczący Komisji Bioetycznej
przy OIL w Krakowie

Dr Mariusz Janikowski

ul. Krupnicza 11 a, 31-123 Kraków
tel. 12 619 17 12
e-mail: a.krawczyk@hipokrates.org

Konto Komisji Bioetycznej
Bank PKO S. A.
65 1240 4650 1111 0000 5149 3957

Streszczenie

Otyłość stanowi jedno z kluczowych wyzwań zdrowia publicznego XXI wieku. W jej przebiegu obserwuje się zaburzenia funkcji endokrynnej tkanki tłuszczowej, związane ze zmienioną produkcją i aktywnością adipokin, a także przewlekły stan zapalny o niskim nasileniu oraz nieprawidłowości metaboliczne. Coraz więcej danych wskazuje, że krioterapia ogólnoustrojowa (WBC, ang. *whole body cryotherapy/cryostimulation*) może stanowić uzupełniającą, niefarmakologiczną strategię wspierającą regulację homeostazy metabolicznej u osób z nadmierną masą ciała. Metoda ta polega na krótkotrwałej ekspozycji organizmu na ekstremalnie niskie temperatury w celu wywołania wieloukładowej odpowiedzi fizjologicznej. Pomimo dobrze udokumentowanego działania przeciwbólowego, przeciwzapalnego i przeciwobrzękowego, jej wpływ na funkcję endokrynną tkanki tłuszczowej, sirtuiny, metabolizm węglowodanów oraz parametry biofizyczne skóry nie został dotychczas w pełni poznany.

Celem pracy była ocena wpływu pojedynczego bodźca kriogenicznego oraz serii 10 i 20 zabiegów krioterapii ogólnoustrojowej na wybrane parametry biofizyczne skóry, profil adipokin i sirtuin oraz wskaźniki metabolizmu węglowodanów u osób z nadwagą i otyłością w porównaniu z osobami o prawidłowym BMI.

Do badania zrekrutowano 80 osób, spośród których 32 spełniły kryteria włączenia. Uczestników zakwalifikowano do grupy badanej (SG, BMI > 27; n = 16) oraz kontrolnej (CG, BMI 18-25; n = 16). Ostatecznie badanie ukończyło 23 uczestników (SG: n = 12; CG: n = 11).

Ocena parametrów biofizycznych skóry obejmowała pomiar nawilżenia warstwy rogowej naskórka, TEWL, pH oraz elastyczności skóry, wykonywany przed i po 1., 10. oraz 20. zabiegu WBC. Analizy biochemiczne krwi przeprowadzono przed interwencją, po 9. i 19. zabiegach oraz 2 tygodnie po zakończeniu serii.

Reakcja skóry na bodziec kriogeniczny wykazywała zróżnicowanie zależne od BMI oraz lokalizacji anatomicznej. U osób z nadwagą i otyłością obserwowano istotną poprawę jędrności skóry twarzy i przedramienia, wzrost nawilżenia oraz zmiany pH w obrębie przedramienia, przy jednoczesnym wzroście TEWL po zakończeniu interwencji w obu grupach. Efekty były bardziej wyraźne w obrębie przedramienia niż skóry twarzy.

Krioterapia ogólnoustrojowa wiązała się ze zmianami wybranych wskaźników metabolicznych, obejmującymi glukozę na czczo, insulinę oraz HbA1c. W grupie badanej obserwowano również korzystne zmiany wskaźników insulinooporności (HOMA-IR, QUICKI) oraz wybranych adipokin i sirtuin. W obu grupach odnotowano spadek leptyny, natomiast odpowiedź innych adipokin oraz sirtuin była zróżnicowana i zależna od liczby zabiegów oraz wyjściowego BMI. U osób z prawidłową masą ciała zaobserwowano wzrost fruktozaminy utrzymujący się w obserwacji odroczonej.

Krioterapia ogólnoustrojowa wydaje się być metodą bezpieczną, która może modulować parametry biofizyczne skóry oraz wybrane wskaźniki metaboliczne. Odpowiedź organizmu na bodziec kriogeniczny zależy od liczby zabiegów, wartości BMI oraz lokalizacji anatomicznej ocenianych obszarów.

Abstract

Obesity is one of the key public health challenges of the 21st century. It is characterized by disturbances in the endocrine function of adipose tissue, associated with altered production and activity of adipokines, as well as low-grade chronic inflammation and metabolic abnormalities. A growing body of evidence suggests that whole-body cryotherapy (WBC) may serve as a complementary, nonpharmacological strategy to support the regulation of metabolic homeostasis in overweight individuals. This method involves brief exposure of the body to extremely low temperatures to induce a multisystem physiological response. Despite its well-documented analgesic, anti-inflammatory, and anti-edematous effects, its impact on the endocrine function of adipose tissue, sirtuins, carbohydrate metabolism, and biophysical parameters of the skin has not yet been fully understood.

The aim of this study was to evaluate the effect of a single cryogenic stimulus and a series of 10 and 20 systemic cryotherapy treatments on selected biophysical parameters of the skin, adipokine and sirtuin profiles, and carbohydrate metabolism indices in overweight and obese individuals compared with individuals with a normal BMI.

A total of 80 individuals were recruited for the study, of whom 32 met the inclusion criteria. Participants were assigned to the study group (SG, BMI > 27; n = 16) and the control group (CG, BMI 18–25; n = 16). Ultimately, 23 participants completed the study (SG: n = 12; CG: n = 11).

The assessment of skin biophysical parameters included measurements of stratum corneum hydration, TEWL, pH, and skin elasticity, performed before and after the 1st, 10th, and 20th WBC treatments. Biochemical blood analyses were conducted before the intervention, after the 9th and 19th treatments, and 2 weeks after the completion of the treatment series.

The skin's response to a cryogenic stimulus varied depending on BMI and anatomical location. In overweight and obese individuals, a significant improvement in skin firmness of the face and forearm, increased hydration, and changes in pH within the forearm were observed, accompanied by an increase in TEWL after the intervention in both groups. The effects were more pronounced in the forearm than in the facial skin.

Systemic cryotherapy was associated with changes in selected metabolic markers, including fasting glucose, insulin, and HbA1c. The study group also showed beneficial changes in insulin resistance markers (HOMA-IR, QUICKI) and selected adipokines and sirtuins. A decrease in leptin was noted in both groups, while the response of other adipokines and sirtuins varied and depended on the number of treatments and baseline BMI. In individuals with normal body weight, an increase in fructosamine was observed that persisted during follow-up.

Systemic cryotherapy appears to be a safe method that can modulate the biophysical parameters of the skin and selected metabolic markers. The body's response to the cryogenic stimulus depends on the number of treatments, BMI, and the anatomical location of the assessed areas.