ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας – Διατροφής
ΠΜΣ "Εφαρμοσμένη Διαιτολογία – Διατροφή"
Κατεύθυνση: Διατροφή και Άσκηση

ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΣΕ ΔΥΟ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ ΕΚΚΕΝΤΡΗΣ ΑΣΚΗΣΗΣ ΣΤΑ ΑΝΩ ΚΑΙ ΚΑΤΩ ΑΚΡΑ ΥΓΙΩΝ ΑΓΥΜΝΑΣΤΩΝ ΕΘΕΛΟΝΤΩΝ - ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ

ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΚΑΜΠΟΥΡΟΠΟΥΛΟΥ

Αθήνα, 2017

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
Τμημα Επιστήμης Διαιτολογίας – Διατροφής
ΠΜΣ "Εφαρμοσμένη Διαιτολογία - Διατροφή"
Κατεύθυνση: Διατροφή και Άσκηση

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Τζώρτζης Νομικός (επιβλέπων)

Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Διατροφής και Διαιτολογίας, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Σμαραγδή Αντωνοπούλου

Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Διατροφής και Διαιτολογίας, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Ρωξάνη Τέντα

Επίκουρη Καθηγήτρια Φυσιολογίας, Τμήμα Διατροφής και Διαιτολογίας, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Η Χριστίνα Καμπουροπούλου,

δηλώνω υπεύθυνα ότι:

1) Είμαι ο κάτοχος των πνευματικών δικαιωμάτων της πρωτότυπης αυτής εργασίας και από όσο γνωρίζω η εργασία μου δε συκοφαντεί πρόσωπα, ούτε προσβάλει τα πνευματικά δικαιώματα τρίτων.

2) Αποδέχομαι ότι η ΒΚΠ μπορεί, χωρίς να αλλάξει το περιεχόμενο της εργασίας μου, να τη διαθέσει σε ηλεκτρονική μορφή μέσα από τη ψηφιακή Βιβλιοθήκη της, να την αντιγράψει σε οποιοδήποτε μέσο ή/και σε οποιοδήποτε μορφότυπο καθώς και να κρατά περισσότερα από ένα αντίγραφα για λόγους συντήρησης και ασφάλειας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ 6

ΠΕΡΙΛΗΨΗ 7

ABSTRACT 8

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ-KEY WORDS 9

Α' ΕΝΟΤΗΤΑ: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 10

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΑΣΚΗΣΙΟΓΕΝΗΣ ΜΥΪΚΗ ΒΛΑΒΗ 10

1.1. Ορισμός ασκησιογενούς μυϊκής βλάβης 10

1.2. Έκκεντρη άσκηση: αιτία πρόκλησης ασκησιογενούς μυϊκής βλάβης 10

1.3. Συμπτώματα ΑΜΒ 11

1.3.1. Αρνητικά συμπτώματα ΑΜΒ 11

1.3.2. Ευεργετικά συμπτώματα ΑΜΒ και προσαρμογές 13

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 : ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΑΣΚΗΣΙΟΓΕΝΟΥΣ ΜΥΪΚΗΣ ΒΛΑΒΗΣ 16

2.1. Δομική βλάβη 16

2.2. Φλεγμονή 17

2.2.1. Διαδικασία αναγέννησης του τραυματισμένου μυϊκού ιστού 18

2.2.2. Κυτταροκίνες: Ο ρόλος τους κατά την άσκηση και μετά από αυτή 20

2.3. Οξειδωτικό στρες 22

2.3.1. Προσδιορισμός κατάστασης οξειδοαναγωγικού στρες 24

2.3.2. Έκκεντρη άσκηση και οξειδωτικό στρες 25

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΣΚΗΣΙΟΓΕΝΗΣ ΜΥΪΚΗ ΒΛΑΒΗ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗ 28

3.1. Συμπληρώματα 28

3.1.1. Αντιοξειδωτικά ή/και αντιφλεγμονώδη διατροφικά συμπληρώματα 28

3.1.2. Συμπληρώματα υδατανθράκων / πρωτεϊνών 35

3.2. Διατροφή 36

Β' ΕΝΟΤΗΤΑ : ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 38

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΚΟΠΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ 38

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ 38

5.1 Γενικό ερευνητικό πρωτόκολλο 38

5.1.1 Δοκιμαζόμενοι έρευνας-Κριτήρια επιλογής 38
5.1.2 Πορεία πειράματος 39

5.2 Πρωτόκολλα άσκησης πρόκλησης ΑΜΒ **40**
5.2.1 Άσκηση άνω άκρων 40
5.2.2 Άσκηση κάτω άκρων 40

5.3 Μετρήσεις **41**
5.3.1 Ανθρωπομετρία 41
5.3.2 Εκτίμηση φυσικής δραστηριότητας 41
5.3.3 Αξιολόγηση διατροφικών συνηθειών 43
5.3.4 Υπολογισμός Μέγιστης Πρόσληψης Οξυγόνου 43
5.3.5 Αξιολόγηση δύναμης των κάτω άκρων (Counter Movement Jump- CMJ, Squat Jump-SQJ) 44
5.3.6 Γωνία μέγιστης κάμψης της άρθρωσης του αγκώνα, και του γονάτου 45
5.3.7 Αντίληψη της έντασης του καθυστερημένου μυϊκού πόνου 45
5.3.8 Περίμετρος 46

5.4 Συλλογή βιολογικών δειγμάτων **46**
5.4.1 Σύλλογη αίματος 46

5.5 Γενική αίματος **47**

5.6 Πρωτόκολλα απομόνωσης κυττάρων **47**
5.6.1 Απομόνωση πλάσματος 47
5.6.2 Απομόνωση ορού 47
5.6.3 Απομόνωση λευκοκυττάρων 48

5.7 Προσδιορισμός της δραστικότητας αντιοξειδωτικών ενζύμων **49**
5.7.1 Προσδιορισμός δραστικότητας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης στον ορό (GPX3) .49
5.7.2 Προσδιορισμός δραστικότητας της υπεροξειδικής δισμουτάσης στον ορό (SOD3) με την μέθοδο οξειδάσης της ξανθίνης/ξανθίνης/κυτοχρώματος c 51
5.7.3 Προσδιορισμός δραστικότητας της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) στα λευκοκύτταρα με την μέθοδο οξειδάσης της ξανθίνης/ξανθίνης/ κυτοχρώματος c 53
5.7.4 Προσδιορισμός πρωτεΐνης με την μέθοδο Bradford 54

5.8 Στατιστική ανάλυση **55**

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 56

6.1 Ανθρωπομετρικά/σωματομετρικά χαρακτηριστικά εθελοντών **56**

6.2 Διατροφικά χαρακτηριστικά **56**

6.3 Επίδραση άσκησης στη δραστικότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων **57**
6.3.1 Επίδραση άσκησης στη δραστικότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης ορού (SOD3) 57
6.3.3 Επίδραση άσκησης στη δραστικότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης στον ορό (GPX3) 59

6.4 Συσχετίσεις μεταξύ των μεταβολών των μετρούμενων δεικτών **60**
6.4.1 Χαρακτηριστικά εθελοντών – Δείκτες ασκησιογενούς μυϊκής βλάβης 60
6.4.2 Συσχετίσεις μεταξύ των μεταβολών των δεικτών οξειδωτικού στρες-με τις μεταβολές δεικτών ασκησιογενούς μυϊκής βλάβης 60
6.4.3 Σύγκριση μεταβολής της δραστικότητας SOD λευκοκυττάρων μεταξύ των δύο πρωτοκόλλων 61

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ 62

7.1 Σχολιασμός μεθοδολογίας πρωτοκόλλων 62

7.2 Δοκιμαζόμενοι και κριτήρια επιλογής 63

7.3 Επιλογή δεικτών ασκησιογενούς μυϊκής βλάβης 64

7.4 Επιλογή δεικτών οξειδωτικού στρες 64

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 68

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία έλαβε χώρα στο Τμήμα Διαιτολογίας και Διατροφής, του Χαροκόπειου Πανεπιστήμιου, υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή Βιοχημείας, κ. Τζώρτζη Νομικό. Θα ήθελα να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον κο. Νομικό, αρχικά για την ευκαιρία που μου έδωσε να συμμετέχω σε αυτή την πολύ ενδιαφέρουσα μελέτη, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε σε όλα τα στάδια του πειράματος, για την προθυμία του να ακούσει, ανά πάσα στιγμή, οποιοδήποτε πρόβλημα ή απορία προέκυπτε, δίνοντας πάντα λύσεις και συμβουλές, καθώς και για τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσε για την σωστή συγγραφή της διπλωματικής μου εργασίας. Τον ευχαριστώ που ήταν φιλικός, προσιτός και προσπάθησε να μου δείξει, μέσα από την έρευνα αυτή, τις δυσκολίες του να στήνεται ένα πρωτόκολλο, και πώς μπορεί κανείς να τις ξεπερνά και να μην απογοητεύεται.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς μου επιτροπής, κα. Αντωνοπούλου, καθηγήτρια Βιοχημείας, και κα Τέντα, επίκουρη καθηγήτρια Φυσιολογίας, την Αντιγόνη Τσιαφίτσα, για την υπομονή της και την καθοριστική βοήθεια της στη μελέτη, τον κο Κωτσή, υποψήφιο Διδάκτορα του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου και κο Αρναούτη, επιστημονικό συνεργάτη, για τις συμβουλές τους στο εργοφυσιολογικό κομμάτι και την συμμετοχή τους στην επιλογή των πρωτοκόλλων άσκησης.

Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τους εθελοντές μας, χάρη στους οποίους πραγματοποιήθηκε η μελέτη αυτή, την συμφοιτήτρια Νίκη, για την άπταιστη και ευχάριστη συνεργασία αλλά και συμπαράσταση, καθώς και τον Στάθη, προπτυχιακό φοιτητή, ο οποίος ήταν πάντα το «τρίτο χέρι» μας.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στους γονείς μου, που στάθηκαν πάντα δίπλα μου, σιωπηλά και ακούραστα, για την ανιδιοτελή τους, θερμή και άμετρη αγάπη...

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Θεωρητικό υπόβαθρο: Η ασκησιογενής μυϊκή βλάβη (ΑΜΒ), που προκαλείται έπειτα από ασυνήθιστη ή/και έκκεντρη άσκηση, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως ένα ελεγχόμενο στρεσογόνο μοντέλο το οποίο θα επέτρεπε να αξιολογηθούν οι δυνατότητες των ενδογενών αντιφλεγμονώδων και αντιοξειδωτικών μηχανισμών του οργανισμού.

Σκοπός: Στόχος της εργασίας ήταν η εφαρμογή δύο πρωτοκόλλων έκκεντρης άσκησης στα κάτω και άνω άκρα, με σκοπό να αναζητηθούν διαφορές στην απόκριση της δραστικότητας τριών αντιοξειδωτικών ενζύμων μεταξύ των δύο πρωτοκόλλων άσκησης.

Μεθοδολογική προσέγγιση: Πέντε αγύμναστοι, υγιείς εθελοντές, εκτέλεσαν 100 άλματα από ύψος με ημικάθισμα, και 80 έκκεντρες κάμψεις δικεφάλων (στο 90% της μέγιστης δύναμής τους) και μετρήθηκαν προ- και μετα άσκησης (αμέσως μετά, 2, 24 και 48 ώρες) οι μεταβολές που επάγονται σε αντιπροσωπευτικούς δείκτες ΑΜΒ και σε τρία αντιοξειδωτικά ένζυμα (υπεροξειδική δισμουτάση ορού και λευκοκυττάρων και υπεροξειδάση της γλουταθειόνης ορού).

Αποτελέσματα: Τόσο στα κάτω, και ιδιαίτερα στα άνω άκρα προκλήθηκε ΑΜΒ μετά τα δύο πρωτόκολλα. Μόνο το πρωτόκολλο των άνω ακρών προκάλεσε αύξηση της υπεροξειδικής δισμουτάσης ορού (24h, 40%). Και τα δύο πρωτόκολλα αύξησαν τη δραστικότητα του ίδιου ενζύμου στα λευκοκύτταρα με παρόμοιο τρόπο, που ήταν πιο έντονες στις 24 και 48 ώρες. Τέλος, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης δεν επηρεάστηκε.

Συμπεράσματα: Τα δυο πρωτόκολλα μπόρεσαν να προκαλέσουν αυξήσεις στη δραστικότητα της κυκλοφορούσας και λευκοκυτταρικής υπεροξειδικής δισμουτάσης, πιθανότατα ως ομοιοστατικός μηχανισμός του οργανισμού στο ασκησιογενές οξειδωτικό στρες. Συνεπώς η μέτρηση των ενζύμων αυτών μετά από πρόκληση ΑΜΒ θα μπορούσε να αποτελέσει μελλοντικά τρόπο εκτίμησης του ενδογενούς αντιοξειδωτικού δυναμικού του ανθρώπινου οργανισμού.

ABSTRACT

Introduction: Exercise induced muscle damage (EIMD), caused after novel, unaccustomed or/and eccentric exercise, could be used as a controlled stressor model that would allow to evaluate system's endogenous anti-inflammatory and anti-oxidant capacity.

Objective: The aim of this study was to investigate and apply two appropriate exercise protocols for upper and lower extremities, so as to compare the response of antioxidant enzymes' activity, after the two protocols.

Methodology: Five untrained, healthy volunteers, performed 100 drop jumps and 80 biceps extensions (90% of their maximal strength), and a range of representative markers for EIMD, as well as the activity of superoxide dismutase (in serum and leukocytes) and glutathione peroxidase (in serum), were measured, pre-, post-exercise, 2, 24 and 48 hours after that.

Results: Both of the two protocols, and in particular the upper extremities' protocol caused muscle damage. Superoxide dismutase activity in serum increased only after the upper limbs protocol (24h, 40%). Both of the two protocols increased the activity of the same enzyme in leukocytes in a similar way that was more pronounced at 24 and 48 hours. Furthermore, glutathione peroxidase was not affected.

Conclusions: The chosen protocols were, actually, able to induce a rise in circulating and leukocyte superoxide dismutase activity, probably as a homeostatic mechanism of oxidative stress, after exercise. Consequently, measurement of these enzymes, following EIMD, could be an effective way of assessing the endogenous antioxidant potential of the human organism.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ-KEY WORDS

Σύντμηση	Αγγλική ονομασία	Ελληνική ονομασία
EIMD / AMB	Exercise Induced Muscle Damage	Ασκησιογενής Μυϊκή Βλάβη
HSPs	Heat Shock Proteins	Πρωτεΐνες Θερμικού Σοκ
NF-κB	Nuclear Factor-κB	Πυρηνικός παράγοντας-κB
IL	Interleukin	ιντερλευκίνη
TNF-a	Tumor Necrosis Factor -a	Παράγοντας νέκρωσης όγκων
BDK	Bradykinin	Βραδυκινίνη
PTG	Prostaglandin	Προσταγλανδίνη
RONS	Reactive Oxygen and Nitrogen Species	Δραστικά Είδη Οξυγόνου και Αζώτου
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	β- νικοτιναμιδο αδενινο φωσφορικό δινουκλεοτίδιο
NOX	NADPH Oxidase	οξειδάση του NADPH
NO	Nitric Oxide	Μονοξείδιο του αζώτου
NOS	Nitric Oxide Synthase	Συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου
XO	Xanthine Oxidase	οξειδάση της ξανθίνης
CK	Creatine Kinase	Κρεατινική κινάση
BCAA	Branched Chain Amino-Acids	Αμινοξέα διακλαδισμένης αλύσου
MET	Metabolic Equivalent of the Task	Μεταβολικό ισοδύναμο Έργου
SQJ	Squat Jump	
CMJ	Counter Movement Jump	
DXA	Dual-energy X-ray Absorptiometry	Απορροφησιομετρία ακτίνων Χ διπλής ενέργειας
VAS	Visual Analog Scale	Οπτική αναλογική κλίμακα
GPX	Glutathione peroxidase	Υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης
SOD	Superoxide Dismutase	Υπεροξειδική δισμουτάση
GR	Glutathione Reductase	Αναγωγάση της Γλουταθειόνης

Α' ΕΝΟΤΗΤΑ: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΑΣΚΗΣΙΟΓΕΝΗΣ ΜΥΪΚΗ ΒΛΑΒΗ

1.1. Ορισμός ασκησιογενούς μυϊκής βλάβης

Οι περισσότεροι άνθρωποι έχουν βιώσει κάποια στιγμή της ζωής τους ένα είδος σωματικού πόνου ή ενόχλησης και συνήθως μετά από μία φυσική δραστηριότητα με την οποία δεν είναι εξοικειωμένοι (Hyldahl & Hubal, 2014). Στην επιστημονική βιβλιογραφία, τα συμπτώματα πόνου και απώλειας δύναμης που εμφανίζονται τις ώρες και ημέρες έπειτα από ασυνήθιστη ή/και πολύ έντονη άσκηση, αποδίδονται κυρίως σε καταστροφή της περίπλοκης δομής του καταπονημένου μυός και συλλογικά αναφέρονται ως «ασκησιογενής μυϊκή βλάβη» (ΑΜΒ) (Armstrong, 1984; Clarkson & Ebbeling, 1988; Morgan & Allen, 1999). Ολοένα και περισσότερες μελέτες, βέβαια, αποδεικνύουν ότι η βιολογία της ΑΜΒ είναι πιο πολύπλοκη απο ότι θεωρούνταν αρχικά· χαρακτηρίζεται από ένα σύνολο συμπτωμάτων και δεν υπάρχει καθιερωμένος ορισμός για αυτήν (Byrne, Twist, & Eston, 2004; Clarkson & Ebbeling, 1988; Lieber & Friden, 2002; Stauber, 1989).

1.2. Έκκεντρη άσκηση: αιτία πρόκλησης ασκησιογενούς μυϊκής βλάβης

Το 1956 εξάχθηκε, από την ερευνητική ομάδα του Asmussen, το συμπέρασμα ότι η έκκεντρη άσκηση αποτελεί την κυρίαρχη αιτία μυϊκής βλάβης, γεγονός που επιβεβαίωσαν και οι περισσότερες μετέπειτα μελέτες, τόσο με έμμεσους όσο και με άμεσους δείκτες ΑΜΒ (Allen, Whitehead, & Yeung, 2005; Friden, Sfakianos, & Hargens, 1986; Vissing, Overgaard, Nedergaard, Fredsted, & Schjerling, 2008), οι οποίοι θα αναλυθούν στη συνέχεια. Διαπιστώθηκε, για πρώτη φορά, ότι τα άτομα που πραγματοποιούσαν ομόκεντρη μυϊκή συστολή κουράζονταν γρηγορότερα σε σχέση με αυτούς που πραγματοποιούσαν έκκεντρη μυϊκή συστολή, παρόλα αυτά μόνο στους τελευταίους εμφανιζόταν «καθυστερημένος μυϊκός πόνος», ο οποίος κορυφωνόταν σε χρονικό διάστημα 12-36 ωρών μετά την άσκηση (Asmussen, 1956).

Πρώτος ο Hough πρότεινε ότι ο παρατεταμένος πόνος και η απώλεια δύναμης που ακολουθεί την έντονη άσκηση είναι αποτέλεσμα μικροσχισμάτων στους μυς (Hough,

1900). Η ιδέα αυτή υποστηρίχθηκε περαιτέρω, στις αρχές της δεκαετίας του 80’, μετά από εξέταση και στον ίδιο το μυ αλλά και στο αίμα των εθελοντών. Ο Newham, με τη βοήθεια της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, παρατήρησε μια αυξανόμενη καταστροφή της μακρο- και μικροδομής των μυϊκών ινών, αμέσως μετά από άσκηση με έντονο έκκεντρο στοιχείο, έως και 30 ώρες μετά (Newham, Jones, & Edwards, 1983). Επίσης, σε άλλο πρωτόκολλο που διεξήχθη από τον Schwane, μετά από τρέξιμο σε επίπεδο διάδρομο δεν παρατηρήθηκε μυϊκό άλγος, ενώ το κατηφορικό, το οποίο απαιτούσε εκτενή έκκεντρη δράση, οδήγησε σε ιδιαίτερο πόνο (μέσα σε 24 έως 48 ώρες) και σε εμφάνιση των ειδικών μυϊκών πρωτεϊνών στο αίμα. Μάλιστα σημειώνεται ότι στους εθελοντές που έκαναν έκκεντρη άσκηση τα επίπεδα του γαλακτικού οξέος στο αίμα, που παλιότερα θεωρούνταν υπέυθυνα για τον πόνο των μυών, ήταν χαμηλότερα (Schwane, Johnson, Vandenakker, & Armstrong, 1983; Schwane, Watrous, Johnson, & Armstrong, 1983).

Αυτά, συνεπώς, ήταν τα πρώτα στοιχεία που απέδειξαν ότι την ασκησιογενή μυϊκή βλάβη προκαλούν οι ασκήσεις έκκεντρου στοιχείου, και μέχρι σήμερα υπάρχει μια πληθώρα μελετών-θα αναφερθούν στην συνέχεια- που εξακολουθούν να το υποστηρίζουν.

1.3. Συμπτώματα ΑΜΒ

1.3.1. Αρνητικά συμπτώματα ΑΜΒ

Τις ασκήσεις έκκεντρης φύσης, ακολουθεί, εκτός από τον καθυστερημένο μυϊκό πόνο, ευαισθησία, μείωση δύναμης, ακαμψία (περιορισμένο εύρος κίνησης), πρήξιμο, καθώς και εμφάνιση ειδικών-μυϊκών πρωτεϊνών στο αίμα (πχ κρεατινική κινάση, μυοσφαιρίνη, γαλακτική αφυδρογονάση, αμινοτρανσφεράση ασπαρτικού, ισοένζυμο ΙΙ της καρβονικής ανυδράσης) (Bessa et al., 2016; Clarkson & Tremblay, 1988; McHugh, Connolly, Eston, & Gleim, 1999). Τα συμπτώματα αυτά, εκ των οποίων η μείωση της δύναμης θεωρείται η πιο αξιόπιστη ένδειξη της ζημιάς(Clarkson & Hubal, 2002; Paulsen, Mikkelsen, Raastad, & Peake, 2012), αποτελούν έμμεσους δείκτες της βλάβης που έχει υποστεί ο μυς, και χρησιμοποιούνται εκτενώς, στα πειράματα ΑΜΒ, ως αντιπροσωπευτικά κριτήρια. Παρόλα αυτά, έχουν γίνει δεκτά ακόμα 118 χαρακτηριστικά που συνυφαίνονται με την έκκεντρη άσκηση, και τα οποία σχετίζονται

με ποικίλα κυτταρικά μονοπάτια, μεταβολές στον μεταβολισμό του γλυκογόνου και τη ρύμιση της ινσουλίνης (C. M. Kerksick et al., 2013).

Ο πόνος και η ευαισθησία κορυφώνεται 1-3 ημέρες μετά την άσκηση, ενώ μέσα σε μία εβδομάδα περίπου έχουν υποχωρήσει. Η ακαμψία και το πρήξιμο είναι εντονότερα 3 μέρες περίπου μετά την άσκηση, με επαναφορά μέσα σε 10 μέρες. Όσον αφορά, τέλος, στην μείωση της δύναμης κορυφώνεται συνήθως ακριβώς μετά την άσκηση ή μέσα στις πρώτες 48 ώρες και αποκαθίσταται, γενικά, σε περισσότερες από 5 ημέρες. Υποστηρίζεται, πιο συγκεκριμένα, ότι σε περιπτώσεις «ήπιας» ΑΜΒ, η δύναμη μειώνεται μέχρι 20%, μέσα στο πρώτο 24ωρο, ενώ τη δεύτερη μέρα έχει επέλθει ανάρρωση, σε αντίθεση με τις περιπτώσεις «σοβαρής» ΑΜΒ, όπου η μείωση παραγωγής δύναμης ανέρχεται πάνω από 50% της αρχικής και χρειάζονται περισσότερες από 7 μέρες για πλήρη αποκατάσταση (D. A. Connolly, Sayers, & McHugh, 2003).

Τα διάφορα συμτώματα της ΑΜΒ μπορούν, είτε να συνυπάρχουν, είτε όχι. Για παράδειγμα ο πόνος δεν συνεισφέρει στην απώλεια της δύναμης, εφόσον δεν υπάρχουν στοιχεία για νευρική παρεμπόδιση του τραυματισμένου μυός (McHugh, Connolly, Eston, & Gleim, 2000) ή αλλαγές στην ενεργοποίηση της κινητικής μονάδας (S. P. Sayers, Knight, Clarkson, Van Wegen, & Kamen, 2001). Ίσως ο πόνος και η ακαμψία είναι περισσότερο συνυφασμένα με φλεγμονώδη απόκριση, παρά πραγματικό τραυματισμό (D. A. Connolly et al., 2003).

Ορισμένες μελέτες έχουν αναφέρει σημάδια νέκρωσης στο μυ φαινομενικά υγιών εθελοντών, μετά από άσκηση. Σε σπάνιες περιπτώσεις, όπως μετά από ακραία στρατιωτική εξάσκηση, έχει διαγνωσθεί ραβδομυόλυση, η οποία γενικά προσδιορίζεται από δριμύ πόνο/ευαισθησία, έντονο πρήξιμο και αδυναμία, αυξημένη δραστηριότητα των μυϊκών πρωτεϊνών στο αίμα, όπως πρωτεϊνική κινάση (> 10,000 IU/L), σκουρόχρωμα ούρα υποδεικνύοντας μυοσφαιριναιμία (Paulsen et al., 2012). Η μυοσφαιριναιμία μπορεί να αποβεί πολύ επικίνδυνη, ιδιαίτερα όταν συνοδεύεται από αφυδάτωση, θερμικό στρες ή υπόταση. Κάποιες από τις περιπτώσεις ραβδομυόλυσης μπορεί να οδηγήσει σε οξεία νεφρική ανεπάρκεια και υποκαλιαιμία (Landau, Kenney, Deuster, & Campbell, 2012; Stephen P. Sayers & Clarkson, 2002)

1.3.1.1. Αρνητικά συμπτώματα ΑΜΒ: Παράγοντες επιρροής

Φυσικά το μέγεθος της βλάβης των μυών μετά από έκκεντρη άσκηση φαίνεται να διαφέρει από περίπτωση σε περίπτωση, στα πειράματα που πραγματοποιούνται, καθότι επηρεάζεται από ποικίλους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένου του πρωτοκόλλου της άσκησης (ταχύτητα, ένταση, διάρκεια, άκρο και τύπος μυϊκών ινών που χρησιμοποιούνται (Howatson & van Someren, 2008), της φυσικής κατάστασης των εθελοντών, της γονιδιακής μεταβλητότητας(Hyldahl & Hubal, 2014).

Τα άνω άκρα, για παράδειγμα, τείνουν να εμφανίζουν μεγαλύτερη βλάβη, συγκριτικά με τα κάτω, γεγονός που πιθανότατα οφείλεται στα πολύ συχνότερα ερεθίσματα άσκησης-έκκεντρης φύσης -όπως είναι το κατέβασμα σκάλας(Howatson & van Someren, 2008). Όσον αφορά στο είδος της έκκεντρης άσκησης, σημειώνεται ότι συνήθως η αερόβια άσκηση (τρέξιμο σε κατηφόρα, κατέβασμα σκάλας) επιφέρουν μικρότερου βαθμού μυϊκή βλάβη, σε σχέση με έκκεντρες ασκήσεις αντίστασης(S. Thiebaud, 2012). Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις ότι οι ταχείες μυϊκές ίνες είναι περισσότερο ευαίσθητες στην ΑΜΒ, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί ξανά στην σπανιότερη χρήση τους ή σε κληρονομική αδυναμία αυτών των ινών. Τέλος, γυναίκες και άντρες φαίνεται ότι ανταποκρίνονται διαφορετικά στην ΑΜΒ. Ισχυρές ενδείξεις, σε πειραματικά όμως μοντέλα, υποστηρίζουν την προστατευτική επίδραση των οιστρογόνων, τα οποία πιθανόν δρουν ως αντιοξειδωτικά ή ως στοιχεία που βοηθούν στην δομική υποστήριξη της ακεραιότητας των σαρκοπλασματικών μεμβρανών. Άλλα πειράματα σε ζώα, προτείνουν ότι οι γυναίκες έχουν, πιθανόν, καλύτερους ομοιοστατικούς μηχανισμούς ασβεστίου. Όμως, τα ευρήματα από μελέτες σε ανθρώπους είναι λιγότερο ξεκάθαρα, λόγω της μεγάλης μεταβλητότητας των έμμεσων δεικτών ΑΜΒ(D. A. Connolly et al., 2003).

1.3.2. Ευεργετικά συμπτώματα ΑΜΒ και προσαρμογές

Παρόλες τις αρνητικές συνέπειες που σχετίζονται με τη μυϊκή βλάβη, η πλαστικότητα των μυών τους επιτρέπει να προσαρμόζονται στην βλάβη και να γίνονται «δυνατότεροι». Η δύναμη και το μέγεθος του μυός αυξάνεται, έπειτα από έκκεντρη άσκηση, και είναι λιγότερο επιρρεπής σε μελλοντική ασκησιογενή βλάβη. Παρόλα αυτά

γεννάται το ερώτημα αν αυτές οι προσαρμογές εξαρτώνται απόλυτα από την ύπαρξη βλάβης(S. Thiebaud, 2012).

Ένα από τα αποτελέσματα της μυϊκής βλάβης που έχουν μελετηθεί περισσότερο είναι «η επίδραση επαναλαμβανόμενων συνεδριών» (Repeated Bout Effect)(Paulsen et al., 2009), μια σειρά προσαρμογών μετά από μια συνεδρία έκκεντρης άσκησης, οι οποίες περιορίζουν την έκταση της μυϊκής βλάβης στις επόμενες συνεδρίες. Ενδιαφέρον, όμως, είναι ότι η προστατευτική αυτή επίδραση υπάρχει ακόμα και μετά από συνεδρία άσκησης που δεν επιφέρει σημαντική μυϊκή βλάβη. Βάσει αυτών, μια καλή στρατηγική για αυτούς που ξεκινούν προπόνηση με αντιστάσεις (αρχάριοι) ή για όσους επανέρχονται σε προπόνηση μετά από μεγάλη περίοδο είναι, αρχικά, μια συνεδρία άσκησης χαμηλής έντασης, με τις προσαρμογές της οποίας ο μυς δεν θα υποστεί τόσο σοβαρή βλάβη σε επόμενη συνεδρία, υψηλότερης έντασης(S. Thiebaud, 2012).

Ο ακριβής μηχανισμός της προστασίας αυτής δεν είναι πλήρως κατανοητός, όμως φαίνεται πως το αρχικό ερέθισμα άσκησης προκαλεί κυτταρικές και νευρικές προσαρμογές, ικανές να μειώσουν το μηχανικό στρες και την πρωτεολυτική απόκριση στην επόμενη συνεδρία. Μια πιθανή προσαρμογή σε μια συνεδρία άσκησης μπορεί να είναι έκφραση πρωτεϊνών θερμικού σοκ (Heat shock proteins-HSPs), η οποία παρατηρείται αυξημένη (για τις HSP27 και HSP70) ιδίως στους Z-δίσκους και στα σημεία που υπάρχουν κατεστραμένα μυοϊνίδια. Η προστασία φαίνεται να έγκειται στην αποκατάσταση των κατεστραμένων πρωτεϊνών και αναδίπλωση νεοσυντιθέμενων μετά την άσκηση(Paulsen et al., 2009).

Μια άλλη πιθανή προσαρμογή μπορεί να είναι η αύξηση κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών, όπως δεσμίνης, τινίνης και δυστροφίνης(Lehti, Kalliokoski, & Komulainen, 2007), καθώς επίσης και η ενδυνάμωση της εξωκυττάριας ουσίας (αυξημένη παρουσία λαμίνης–B1, πρωτεΐνες κολλαγόνου τύπου I και II)(Mackey et al., 2011).

Τέλος, ένα από τα πιο ενδιαφέροντα ευρήματα είναι ότι δεν χρειάζεται να συμβεί άμεση βλάβη στο μυ για να αποκτήσει προστασία, αλλά μπορεί να την αποκτήσει και έμμεσα με την «μεταφερόμενη επίδραση επαναλαμβανόμενων συνεδριών» (repeated bout cross-transfer effect), φαινόμενο κατά το οποία μετά από μονόπλευρη άσκηση ενός άκρου, θα αυξηθεί η δύναμη και του ίδιου αλλά και του ετερόπλευρου(Munn, Herbert, & Gandevia, 2004). Η προστατευτική αυτή επίδραση είναι πιθανότατα

αποτέλεσμα νευρικών μηχανισμών, όπως πρότειναν οι Starbuck και Eston. (Starbuck & Eston, 2012)

Με την ασκησιογενή βλάβη σχετίζεται, επίσης, η μυϊκή υπερτροφία. Μάλιστα οι ερευνητές, έπειτα από συνολική διερεύνηση των μελετών, καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι το ίδιο το ερέθισμα της άσκησης είναι αυτό που θα προκαλέσει υπερτροφία, και όχι τόσο αν η σύσπαση είναι έκκεντρη ή ομόκεντρη-μετά από σύγκριση σε πρωτόκολλα άσκησης αντιστοιχισμένα σε ένταση και έργο (Moore, Young, & Phillips, 2012).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 : ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΑΣΚΗΣΙΟΓΕΝΟΥΣ ΜΥΪΚΗΣ ΒΛΑΒΗΣ

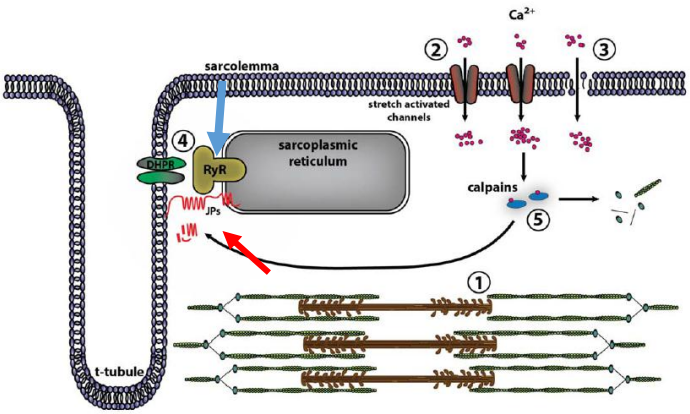
2.1. Δομική βλάβη

Η επικρατέστερη και πιο ελκυστική θεωρία περί μυϊκής βλάβης, χωρίζει την διαδικασία αυτή σε 3 φάσεις(C. M. Kerksick et al., 2013). Στην πρώτη φάση συμβάλλουν τόσο το μεταβολικό όσο και το μηχανικό στρες, εκ των οποίων η συνεισφορά του τελευταίου θεωρείται η κυριότερη(Friden, Sjostrom, & Ekblom, 1983).

Όταν ο μυς εκτείνεται, το ποσοστό της επικάλυψης μεταξύ μυοσίνης και ακτίνης μειώνεται στα επιμέρους σαρκομέρια. Το «τέντωμα» που συμβαίνει είναι μεγαλύτερο για τα ασθενέστερα σαρκομέρια(Proske & Allen, 2005). Η έκταση του μυός παράγει μεγαλύτερη ισχύ από την συστολή, καθώς επιστρατεύονται λιγότερες κινητικές μονάδες, γεγονός που αυξάνει την τάση στην κάθε μυϊκή ίνα(Enoka, 1996). Τα υψηλά επίπεδα τάσης, στα τεντωμένα σαρκομέρια, μπορούν να προκαλέσουν διαταραχή της αλληλεπικάλυψης των μυονημάτιων. Την προστιθέμενη τάση, λόγω της διαταραγμένης αλληλεπικάλυψης ακτίνης-μυοσίνης σε κάποια σαρκομέρια- ή αλλιώς ανομοιόμορφης επιμήκυνσης- θα υποστεί η κυτταροσκελετική πρωτεϊνική μήτρα της μυϊκής ίνας, και ιδιαίτερα στην περιοχή Z-δίσκων(Proske & Allen, 2005), όπως φαίνεται ξεκάθαρα και από τις μυϊκές βιοψίες μετά από πρωτόκολλα έκκεντρων ασκήσεων(D. A. Connolly et al., 2003; S. Thiebaud, 2012). Μετά από επαναλαμβανόμενες και μεγαλύτερης έντασης εκτάσεις, η τάση στη μυϊκή ίνα θα αυξηθεί περισσότερο και η μυϊκή βλάβη θα εξαπλωθεί και σε άλλους Z-δίσκους και σαρκομέρια της μυϊκής ίνας, με λίγα σαρκομέρια να παραμένουν άθικτα. Αποτέλεσμα αυτού θα είναι μια αλλαγή της βέλτιστης σχέσης μήκους-τάσης του μυός(Whitehead, Morgan, Gregory, & Proske, 2003).

Το μηχανικό στρες στην μυϊκή ίνα, δεν είναι ικανό να καταστρέψει μόνο τη δομή του σαρκομερίου, όπως περιγράφτηκε παραπάνω, αλλά και τη σύζευξη διέγερσης-σύσπασης (excitation contraction coupling complex), καταλήγοντας έτσι σε απώλεια δύναμης. Επισημαίνεται, από τον Warren και την ερευνητική ομάδα του(Warren, Ingalls, Lowe, & Armstrong, 2001), ότι αυτό συμβαίνει λόγω διαταραχής στη σύνδεση μεταξύ των T-σωληναρίων και των υποδοχέων ρυανοδίνης (RyR) (κανάλια ασβεστίου) στη μεμβράνη του σαρκοπλασματικού δικτύου. Ένας τύπος πρωτεΐνης που εμπλέκεται σε αυτή τη σύνδεση είναι η τζανκτοφιλίνη (junctophilin-JPH), η οποία επιτρέπει την

άμεση επαφή των υποδοχέων με το σύστημα σωληναρίων Τ. (Corona et al., 2010) (Εικόνα 2.1)



Εικόνα 2.1: *Σύνδεση RyR (μπλε βέλος) με Τ-σωληνάρια, μέσω Τζανκτοφιλίνης (JPH) (κόκκινο βέλος)(Hyldahl & Hubal, 2014)*

Δεν είναι, βέβαια, μόνο το μηχανικό στρες αυτό που προκαλεί ζημιά στη μυϊκή ίνα, αλλά φαίνεται να παίζει σπουδαίο ρόλο και η ενεργοποίηση των καλπαϊνών (ασβέστιο-εξαρτώμενων πρωτεϊνών). Η ενεργοποίηση ιονικών καναλιών, λόγω της σύσπασης, μπορεί να αυξήσει τα επίπεδα του ενδοκυτταρικού ασβεστίου. Τότε ενεργοποιούνται αυτές οι πρωτεάσες ασβεστίου, οι καλπαΐνες, που διασπούν πρωτεΐνες όπως την τινίνη, τη δεσμίνη, τη νεμπουλίνη, την τροπονίνη, την τροπομυοσίνη, κινάσες και άλλα σηματοδοτικά μόρια, καταστρέφοντας ακόμα περισσότερο το μυ. Καθώς οι κατεστραμένες μυϊκές ίνες συνεχίζουν να συσσωρεύονται αυξάνεται η φλεγμονή, ούτως ώστε τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα να εισέλθουν στις μυϊκές ίνες (Pizza, Koh, McGregor, & Brooks, 2002), φαινόμενο που συμπεριλαμβάνεται στην τρίτη φάση της συνολικής διαδικασίας. Αυτή η ανισορροπία της ομοιόστασης του ασβεστίου, λοιπόν, επιδεινώνει τη βλάβη, καθώς διευκολύνει έναν καταρράκτη γεγονότων που οδηγούν σε μεταβολή αρκετών κυτταρικών δομών, και αποτελεί τη δεύτερη φάση της ΑΜΒ(C. M. Kerksick et al., 2013).

2.2. Φλεγμονή

Στα πειράματα έκκεντρης άσκησης, ενα πολύ κοινό εύρημα, είναι η συσσώρευση των φλεγμονωδών κυττάρων (κυρίως μονοκυττάρων/μακροφάγων), στο ενδομύιο και ιδιαίτερα στο περιμύιο, αλλά σε ακραίες περιπτώσεις μπορεί να συμβεί και μαζική διείσδυση αυτών μέσα στις μυϊκές ίνες και συσσώρεύση τους στα κύτταρα. Τα

λευκοκύτταρα ξεκινούν να διεισδύουν στο μυϊκό ιστό ακριβώς μετά την άσκηση, αλλά συνήθως ανιχνεύονται στον εξωκυττάριο χώρο 24-48 ώρες μετά, ενώ στον ενδοκυττάριο περίπου 4-7 μέρες μετά για τις περιπτώσεις νεκρωτικών μυϊκών ινών (C. M. Kerksick et al., 2013). Γενικά, η συσσώρευση των λευκοκυττάρων δείχνει ότι καθορίζεται ανάλογα με το βαθμό έκτασης της βλάβης. Βέβαια, πρόσφατη ανασκόπηση (Paulsen et al., 2012) σημειώνει ότι μπορεί να υπάρξουν συμπτώματα ΑΜΒ, όπως καθυστερημένος μυϊκός πόνος και αυξημένη ένταση στους μυς, χωρίς κλασικά σημάδια φλεγμονής.

Επιπλέον, η φλεγμονώδης απόκριση χαρακτηρίζεται και από οίδημα, λόγω διήθησης υγρού και πρωτεϊνών πλάσματος μέσα στον προσβεβλημένο ιστό(Smith, 1991).

Η έκταση της βλάβης και της φλεγμονής έχει τεράστιο εύρος. Η βιβλιογραφία περιέχει πολλά αντικρουόμενα αποτελέσματα για την ΑΜΒ, η μεταβλητότητα των οποίων οφείλεται εν μέρει στο γεγονός ότι δεν έχει δοθεί ακριβής ορισμός και κριτήρια για τις έννοιες μυϊκή βλάβη και φλεγμονή, ούτε υπάρχει ένας κοινός αποδεκτός τρόπος να μετράται ο βαθμός της ΑΜΒ. Παρόλα αυτά, μελέτες τόσο στα ζώα όσο και στους ανθρώπους έχουν αποδείξει επανειλημμένως ότι η σοβαρή ΑΜΒ συνοδεύεται με συσσώρευση λευκοκυττάρων, τμηματική νέκρωση μυονιδίων και, συνακολούθως, αναγέννηση με δραστηριοποίση των δορυφορικών κυττάρων(Paulsen et al., 2012).

Σχετικά με την λειτουργικότητα του μυός κατά τη φλεγμονή, οι McCully και Faulkner έχουν αναφέρει υψηλή συσχέτιση μεταξύ ολικής μυϊκής καταστροφής - εμφανής κυτταρική διείσδυση λευκοκυττάρων και νέκρωση μυϊκής ίνας- και μείωσης της ικανότητας παραγωγής δύναμης(McCully & Faulkner, 1986).

2.2.1. Διαδικασία αναγέννησης του τραυματισμένου μυϊκού ιστού

Μετά από έκκεντρη άσκηση που προκαλεί την ΑΜΒ, και ειδικά όταν αυτή περιλαμβάνει αντιστάσεις, τα μονοκύτταρα και τα ουδετερόφιλα (Arnold et al., 2007), αυξάνονται στην κυκλοφορία, ως αποτέλεσμα του στρες που υφίσταται ο μυς αλλά και των ορμονικών σημάτων(Freidenreich & Volek, 2012). Το πότε και σε τι βαθμό θα εκκριθούν τα λευκοκύτταρα, εξαρτάται από την ίδια την άσκηση, την ηλικία και το διατροφικό προφίλ του ασκούμενου(Bermon, Philip, Candito, Ferrari, & Dolisi, 2001; Carlson et al., 2008; Mayhew, Thyfault, & Koch, 2005).

Ταυτόχρονα, ο μυϊκός ιστός απελευθρώνει χημειοκίνες (ορμόνες τραύματος), οι οποίες ελκύουν τα ουδετερόφιλα στον κατεστραμένο ιστό, ώστε αυτά να προκαλέσουν οξειδωτική καταστροφή των μεμβρανών των μυϊκών κυττάρων και να απομακρύνουν τα κυτταρικά υπολείμματα, μαζί με τα μακροφάγα, μέσω φαγοκυττάρωσης (Tidball & Villalta, 2010). Τα μέρη των μυικών ινών που έχουν υποστεί πλήρη νέκρωση, φαίνεται ότι επάγουν πολύ ισχυρό χημειοτακτικό σήμα στα λευκοκύτταρα, παρόλα αυτά τα λευκοκύτταρα ίσως «καλούνται» και από τον ασκηθέντα μυϊκό ιστό που δεν είναι νεκρωτικός(Paulsen et al., 2012). Βέβαια, είναι γνωστό ότι η φαγοκυττάρωση είναι μια διαδικασία εξαιρετικά ειδική για το νεκρωτικά κομμάτια. Τα μακροφάγα επιτίθενται μόνο σε αυτά, ενώ οι μυϊκες ίνες που έχουν διατηρηθεί άθικτες λειτουργούν σαν εκμαγεία για τον σχηματισμό των νέων από τα δορυφορικά κύτταρα(Jarvinen, Jarvinen, Kaariainen, Kalimo, & Jarvinen, 2005).

Τα μονοκύτταρα διεισδύουν στον μυϊκό ιστό και διαφοροποιούνται σε μακοφάγα(Arnold et al., 2007). Τα μακροφάγα πραγματοποιούν άκρως απαραίτητες λειτουργίες για την επιδιόρθωση των μυών, όπως το να βοηθούν τα δορυφορικά κύτταρα στη στρατολόγηση μονοκυττάρων, το να διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των δορυφορικών κυττάρων και διαφοροποίησή τους με τα μονοκύτταρα, το να προωθούν την επιβίωση μυογενών πρόδρομων κυττάρων, μέσω της κυτταρικής συγκόλλησης, και τέλος το να μεσολαβούν στην επιδιόρθωση της εξωκυττάριας ουσίας (Freidenreich & Volek, 2012). Οι ινοβλάστες επίσης, ως απάντηση στο μυϊκό τραυματισμό, πολλαπλασιάζονται και αρχίζουν να συνεισφέρουν κι αυτοί στη δημιουργία μιας πλούσιας σε κολλαγόνο εξωκυττάριας ουσίας, προκειμένου να αποκαταστήσουν τον μυϊκό συνδετικό ιστό, εκκρίνοντας -τις γλυκοπρωτεΐνες- ινονεκτίνη, λαμινίνη, ειδικές τενασκίνες και μόρια προσκόλλησης νευρικών κυττάρων(Melo, Carey, & Brandan, 1996). Τέλος, τα κύτταρα εντός της μικροκυκλοφορίας, δηλαδή τα ενδοθηλιακά και περιθηλιακά κύτταρα, είναι σημαντικοί ρυθμιστές της αγγειογέννεσης και μυογένεσης, γεγονός που τα καθιστά βασικούς συντελεστές τόσο της δημιουργίας αγγείων όσο και μυών μετά από τραυματισμό(Abou-Khalil, Mounier, & Chazaud, 2010).

Όλα τα παραπάνω είδη κυττάρων που αναφέρθηκαν (ενδοθηλιακά και περιθηλιακά κύτταρα, ινοβλάστες, ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα/μακροφάγα) συνεισφέρουν στην έκκριση διαφόρων ειδών κυτταροκινών, στο σκελετικό μύ(Peake, Della Gatta, Suzuki, & Nieman, 2015).

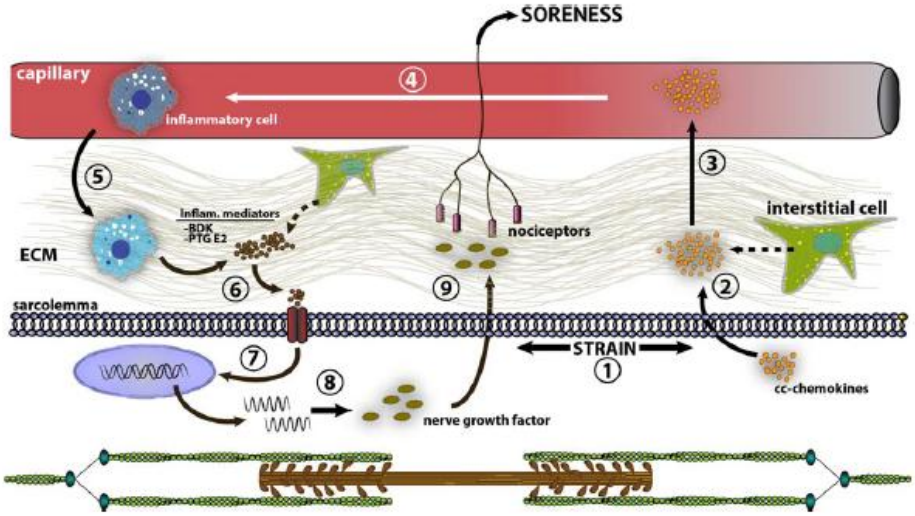
2.2.2. Κυτταροκίνες: Ο ρόλος τους κατά την άσκηση και μετά από αυτή

Οι κυτταροκίνες συγκροτούν μια μεγάλη οικογένεια πολυπεπτιδίων ή πρωτεϊνών, οι περισσότερες εκ των οποίων μεταφέρονται μέσω της συστηματικής κυκλοφορίας και συντίθενται ταχέως από ποικίλλους τύπους κυττάρων, ως απόκριση διαφόρων ερεθισμάτων. Στην οικογένεια αυτή περιλαμβάνονται χημειοκίνες, ιντερλευκίνες, ιντερφερόνες, αυξητικοί παράγοντες, παράγοντες διέγερσης αποικιών, μέλη του παράγοντα νέκρωσης όγκων – α (TNF-α), αυξητικοί παράγοντες μετασχηματισμού. Από τη στιγμή που θα εκκριθούν, διαμεσολαβούν στην ενδοκυτταρική επικοινωνία τοπικά ή συστηματικά (ενδοκυτταρικοί αγγελιοφόροι). Σημειώνεται, μάλιστα, ότι ένα είδος κυττάρων μπορεί να εκφράσει και να εκκρίνει διαφορετικές κυτταροκίνες ταυτόχρονα, απαντώντας σε ένα μόνο ερέθισμα. Το βιολογικό αποτέλεσμα που θα προκύψει, εξαρτάται από την παρουσία και τη συγκέντρωση και των άλλων κυτταροκινών με συνεργιστικό και προσθετικό τρόπο. Κύρια λειτουργία τους είναι η ρύθμιση των λειτουργιών του ανοσοποιητικού συστήματος. Παρόλα αυτά, η ευρεία επίδρασή τους στον πολλαπλασιασμό, στη διαφοροποίηση, στη μετανάστευση, στην επιβίωση και στην απόπτωση των κυττάρων, τους επιτρέπει να παίζουν σημαντικό ρόλο και στον ομοιοστατικό έλεγχο των διαφόρων ιστών, οργάνων και συστημάτων(Peake et al., 2015). Οι μεταβολές κυτταροκινών που προκαλούνται από την άσκηση, αναπαριστούν μια γενικότερη απόκριση σε εσωτερικό ή/και εξωτερικό στρες. Παράγοντες όπως οξειδοαναγωγικό στρες, κατεστραμένες/ξεδιπλωμένες πρωτεΐνες, υπερθερμία ή ενεργειακή ανισορροπία οδηγούν σε παραγωγή κυτταροκινών, μέσω των κατεχολαμινών, αλαρμινών, ενδοτοξινών, του ATP ή των ίδιων των προφλεγμονωδών κυτταροκινών(Welc & Clanton, 2013).

Αρχικά, η έρευνα της άσκησης εστίαζε στο ρόλο των κυτταροκινών ως μεσολαβητές φλεγμονώδους απόκρισης στην ΑΜΒ, όπως περιγράφηκε στο προηγούμενο υποκεφάλαιο. Όμως, τα δεδομένα της τελευταίας δεκαετίας δείχνουν ότι οι κυτταροκίνες έχουν πολύ ευρύτερη συμμετοχή κατά τη διάρκεια της άσκησης. Δρούν με τρόπο που ομοιάζει τις ορμόνες, μεσολαβώντας στον μεταβολισμό του ασκούμενου μυός, του ήπατος, του λιπώδους ιστού, στην αγγειογέννεση και τη νευροβιολογία(Pedersen, 2011). Μετά από άσκηση, υπάρχει αύξηση στις συγκεντρώσεις αρκετών κυτταροκινών στην κυκλοφορία. Η γονιδιακή έκφραση μερικών από αυτές αυξάνεται και μέσα στο μυ. Παρόλα αυτά, εμφανίζεται ένα χάσμα

μεταξύ της γονιδιακής έκφρασης των κυτταροκινών τοπικά στο μυ (μυοκίνες), και στην κυκλοφορία, με εξαίρεση την ιντερλευκίνη 6 (IL-6) (Febbraio, Steensberg, Starkie, McConell, & Kingwell; Fischer et al., 2004; Steensberg et al., 2001; Steensberg et al., 2002) -η περισσότερο μελετημένη μυοκίνη, με αντιφλεγμονώδη δράση, που εκκρίνεται κυρίως απο τα μονοκύτταρα και λεμφοκύτταρα και λειτουργεί και ως αισθητήρας ενέργειας(Petersen & Pedersen, 2005). Για παράδειγμα, μετά την άσκηση, η έκφραση του παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF)-a και της ιντερλευκίνης (IL)-1b αυξάνεται μέσα στο μυ, αλλά η συγκέντρωσή τους στην κυκλοφορία δεν μεταβάλλεται ή ίσως αυξάνεται ελάχιστα. Αντίθετα, οι συγκεντρώσεις του ανταγωνιστή του υποδοχέα IL-1 (IL-1ra), καθώς και της IL-10 αυξάνοται αξιοσημείωτα, χωρίς όμως να αυξάνονται και μέσα στο μυ(Peake et al., 2015).

Ένα εν δυνάμει θεωρητικό μοντέλο που συνδέει τις χημειοκίνες με την εμφάνιση πόνου μετά τις έκκεντρες ασκήσεις, απεικονίζεται στο παρακάτω σχήμα (Εικόνα 2.2).



Εικόνα 2. 2*:* Θεωρητικό μοντέλο που συνδέει την εμφάνιση χημειοκινών με τον πόνο μετά από έκκεντρη άσκηση (Hyldahl & Hubal, 2014).

Από τις ερεθισμένες/κατεστραμμένες μυϊκές ίνες ή από τα κύτταρα που υπάρχουν στην εξωκυττάρια μήτρα (διακεκομμένη γραμμή) απελευθερώνονται, χημειοκίνες, οι οποίες μπαίνουν στην κυκλοφορία και στρατολογούν τα φλεγμονώδη κύτταρα. Τα τελευταία, διεισδύουν στο μυϊκό ιστό και απελευθερώνουν χημικούς μεσολαβητές, όπως βραδυκινίνες (BDK) και προσταγλαδίνες (PTG E2). Αυτοί, είτε θα δράσουν κατευθείαν στους αλγοϋποδοχείς, είτε θα συνδεθούν με εξωκυττάριους υποδοχείς, θα επάγουν την έκφραση ορισμένων πρωτεϊνών (πχ νευρικού αυξητικού παράγοντα), οι οποίες με

τη σειρά τους θα συνδεθούν στους μυϊκούς αλγοϋποδοχείς, με αποτέλεσμα την παραγωγή πόνου (Hyldahl & Hubal, 2014).

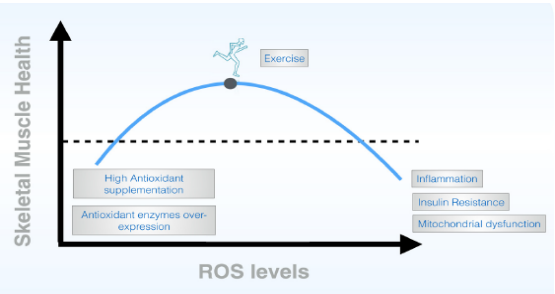
Συμπερασματικά, οι κυτταροκίνες και χημειοκίνες ρυθμίζουν μια πληθώρα μεταβολικών, ενδοκρινικών και ανοσοποιητκών λειτουργιών και δεν είναι ξεκάθαρο εάν αποτελούν αιτία ή αποτέλεσμα της μυϊκής βλάβης. Γι' αυτό και η σχέση μεταξύ κυτταροκινών και δεικτών μυϊκής βλάβης είναι ακόμα υπό διερεύνηση(Paulsen et al., 2012).

2.3. Οξειδωτικό στρες

Το πόρισμα ότι το οξειδωτικό στρες προωθείται από την άσκηση βγήκε πρώτη φορά πριν το 1978, μετά από μελέτες που μέτρησαν την οξειδωτική βλάβη σε κυτταρικά συστατικά (πχ λιπίδια, πρωτεΐνες ή/και DNA) (Dillard, Litov, Savin, Dumelin, & Tappel, 1978). Ως «οξειδωτικό στρες» έχει οριστεί η διαταραχή ισορροπίας μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών, υπέρ των πρώτων, η οποία επηρεάζει την οξειδοαναγωγική σηματοδότηση και ρύθμιση(Betteridge, 2000). Κατά τη διάρκεια της άσκησης πολλοί ειναι οι ιστοί που μπορούν να παράγουν Δραστικά Είδη Οξυγόνου αλλά και Αζώτου (Reactive Oxygen and Nitrogen Species-RONS), όμως η ακριβής συνεισφορά αυτών δεν μπορεί να μελετηθεί αρκετά, λόγω της δύσκολης πρόσβασης στους περισσότερους ιστούς (Powers & Jackson, 2008). Επιπλέον, σημαντικές ποσότητες RONS μπορούν να παράγονται στο ίδιο το πλάσμα του αίματος και τα συστατικά του, καθώς περιέχει μια πληθώρα υποστρωμάτων που δύνανται να οξειδωθούν (κυρίως στα ερυθροκύτταρα και τα λευκοκύτταρα). Συνεπώς αν ανιχνευθεί οξειδωμένο μόριο στο αίμα, δεν είναι απαραίτητο ότι αυτό θα έχει οξειδωθεί μέσα στο μυϊκό ή σε άλλο ιστό. Είναι λογικό να θεωρηθεί ότι υπάρχει μια αμφίδρομη κίνηση αυτών από το αίμα στους μυς και το αντίστροφο, μέχρι να επιτευχθεί ισορροπία. Με αυτή τη λογική, ανταλλαγή μπορεί να συμβαίνει και μεταξύ των διαφόρων συστατικών των κυττάρων, δηλαδή μεταξύ πλάσματος, ερυθροκυττάρων, λευκοκυττάρων και αιμοπεταλίων, λαμβάνοντας όμως υπόψη ορισμένες παραδοχές: τον επαρκή χρόνο ημιζωής τους, την ικανότητά τους να διαπερνούν μεμβράνες και την δημιουργία RONS κοντά στο τμήμα που εξετάζεται (πχ, ανταλλαγή μεταξύ μεμβράνης του πλάσματος του

σκελετικού μυός και μεμβρανών των κυττάρων μέσα στα τριχοειδή αγγεία)(Nikolaidis & Jamurtas, 2009).

Δραστικά είδη οξυγόνου και αζώτου, μπορεί να είναι οι ελεύθερες ρίζες στις οποίες εμπλέκεται οξυγόνο ή άζωτο αντίστοιχα, όπως οι ρίζες υπερυπεροξειδίου ($O_2^{\cdot -}$), υδροξυλίου ($OH^{\cdot}$), το μονοξείδιο του αζώτου ($NO^{\cdot}$), και ενώσεις που δεν είναι ρίζες όπως το υπεροξείδιο H_2O_2, το μονήρες οξυγόνο ($^1O_2$), η υπεροξυνιτρώδης ρίζα ($OONO^-$), το υποχλωριώδες οξύ (OHCl), το οξυγόνο απλής κατάστασης ($^1O_2$) κ.α. (Castrogiovanni & Imbesi, 2012). Η παραγωγή RONS είναι μια φυσιολογική διαδικασία της αερόβιας ζωής, αλλά και ενδεικτική του οξειδωτικού στρες κατά την φυσική δραστηριότητα ή πιο συγκεκριμένα κατά τη διάρκεια που το μυϊκό έργο αυξάνεται και άρα η κατανάλωση του οξυγόνου είναι μεγαλύτερη. Από τη στιγμή που η κατανάλωση οξυγόνου αυξάνεται κατά την άσκηση, είχε θεωρηθεί ότι τα μιτοχόνδρια αποτελούν την κύρια πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών. Όμως πρόσφατες έρευνες δείχνουν πως, ενώ πράγματι τα μιτοχόνδρια έχουν μεγάλη συνεισφορά στα δραστικά είδη οξυγόνου σε κατάσταση ηρεμίας, κατά την μυϊκή συστολή δε συμβαίνει το ίδιο. Η παραγωγή αυτών προέρχεται κυρίως από μη-μιτοχονδριακές πηγές (Diaz-Vegas et al., 2015; Sakellariou et al., 2013), όπως είναι η η οξειδάση NADPH (NOX), η συνθάση το μονοξειδίου του αζώτου (NOS), ή ασβεστιο-εξαρτώμενη ισομορφή της φωσφολιπάσης (A_2PLA_2) και η οξειδάση της ξανθίνης (XO)(Mason & Wadley, 2014). Γενικά, τα RONS σχετίζονται με βλάβη στις κυτταρικές λειτουργίες και το είδος της βλάβης αυτής εξαρτάται από τη φύση τους. Οι βλάβες που επάγονται από το οξειδωτικό στρες έχουν συσσωρευτικές επιδράσεις και έχουν συνδεθεί με παθολογικές καταστάσεις, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου, του διαβήτη και νευρολογικών ασθενειών. Γι'αυτό και μοιάζει παράδοξο ότι παρόλο που η άσκηση προκαλεί οξειδωτικό στρες, η τακτική προπόνηση είναι συνδεδεμένη με πολλά οφέλη, όπως μειωμένος κίνδυνος για καρδειαγγειακά νοσήματα, καρκίνο, διαβήτη και γενικά θνητότητα(Powers, Nelson, & Hudson, 2011). Οι ευεργετικές κυτταρικές προσαρμογές λόγω των αυξημένων RONS, κατά τη διάρκεια της άσκησης, που τελικά οδηγούν σε απόκτηση μιας νέας ομοιόστασης, φαινόμενο γνωστό ως «όρμηση» (Hormesis) (Εικόνα 2.3), έχουν εξεταστεί ενδελεχώς σε



Εικόνα 2. 3: Θεωρητική καμπύλη για την δοσοεξαρτώμενη απόκριση των σκελετικών μυών στα ROS.(Espinosa, Henriquez-Olguin, & Jaimovich, 2016)

αρκετές ανασκοπήσεις, οι οποίες καταλήγουν στο ότι «μικρές δόσεις «δηλητηρίου» μπορούν να προστατεύσουν από τις συνέπειες μιας μεγάλης δόσης»'.

Συνοπτικά, ενεργοποούνται κάποια οξειδοαναγωγικά-σηματοδοτικά μονοπάτια, εκ των οποίων φαίνεται να ξεχωρίζει η συμμετοχή του πυρηνικού παράγοντα-κΒ (NF-κB), της κινάσης ενεργοποιούμενης από το AMP (MAPK) και του μεταγραφικού συνενεργοποιητή PGC-1α, και ως αποτέλεσμα, επάγεται η μιτοχονδριακή βιογένεση, βελτιώνεται η αερόβια ικανότητα, η αντιοξειδωτική άμυνα, η αγγείωση καθώς επίσης και η ινσουλινοευαισθησία (Alleman, Katunga, Nelson, Brown, & Anderson, 2014; Espinosa et al., 2016; Ji, 2015). Τα μονοπάτια αυτά εμπλέκονται και σε άλλες ζωτικές βιολογικές λειτουργίες όπως η φλεγμονή, ο πρωτεϊνικός μεταβολισμός, τα σήματα από το ασβέστιο, η απόπτωση και η αυτοφαγία(Espinosa et al., 2016; Ji, 2015). Επίσης, μια κυτταροπροστατευτική απόκριση του σκελετικού μυός είναι η αυξημένη παραγωγή πρωτεϊνών θερμικού σοκ (Heat Shock Proteins-HSPs). Αυξημένη συγκέντρωση HSPs, ως αποτέλεσμα του στρες, πιστεύεται ότι παρέχει σημαντική προστασία σε μετέπειτα στρεσσογόνο περιόδο, και διευκολύνει την ταχεία αποκατάσταση και αναδιαμόρφωση σε περίπτωση μελλοντικής βλάβης (Castrogiovanni & Imbesi, 2012).

Τις πρώτες άμεσες ενδείξεις ότι η μέγιστη άσκηση αυξάνει την ενδομυϊκή συσσώρευση ελευθέρων ριζών, έδωσαν ο Bailey και η ερευνητική του ομάδα, χρησιμοποιώντας ηλεκτρονική παραμαγνητική φασματοσκοπία συντονισμού(Bailey et al., 2007). Σημειώνεται, όμως, ότι είναι δύσκολο να προσδιοριστεί επακριβώς σε ποια ένταση άσκησης αυξάνονται στο μυ τα RONS, και φαίνεται πως ακόμα και η υπομέγιστη άσκηση (μέτρια προς υψηλή έντασης) είναι αρκετή για να αυξήσει τους βιοδείκτες οξειδωτικού στρες(Mason & Wadley, 2014). Η υπερβολικά εντατική άσκηση δε, που συνοδεύεται από αυξημένο οξειδωτικό στρες, μπορεί να καταλήξει και σε απόπτωση του μυϊκού ιστού(Nishita, Ohohashi, & Asari, 1995).

2.3.1. Προσδιορισμός κατάστασης οξειδοαναγωγικού στρες

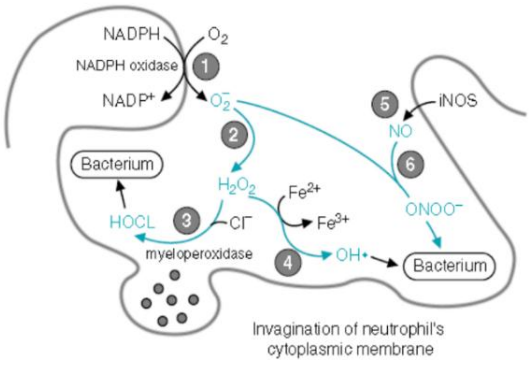
Αξίζει να σημειωθεί, στο σημείο αυτό, ότι δεν υπάρχει ένας μεμονωμένος βιοδείκτης που μπορεί να θωρηθεί «χρυσός κανόνας» για την κατάσταση του οξειδοαναγωγικού στρες, συνεπώς η εκτίμησή του πρέπει να λαμβάνει υπόψη μια σειρά ενώσεων, όπως οι σταθεροί μεταβολίτες (πχ νιτρικά/νιτρώδη), ή/και οι συγκεντρώσεις των στόχων οξείδωσης, όπως τα προϊόντα με υπεροξειδωμένα λιπιδικά

άκρα (ισοπροστάνια, μηλονύλο-διαλδεΰδη, λιπιδικά υδροϋπεροξείδια, συζευγμένα διένια, οξειωμένη λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας), οξειδωμένες πρωτεΐνες (πρωτεϊνικά καρβονύλια, μεμονομένα οξειδωμένα αμινοξέα, νιτροτυροσίνη), και οξειδωμένα νουκλεϊκά οξέα. Επιπροσθέτως, μπορεί να αξιολογηθεί από τις μεταβολές της αντιοξειδωτικής άμυνας, μετρώντας για παράδειγμα την ανηγμένη και οξειδωμένη γλουταθειόνη (βασικό ενδογενές αντιοξειδωτικό), καθώς επίσης την δραστικότητα συγκεκριμένων αντιοξειδωτικών ενζύμων (αναγωγάση γλουταθειόνης, υπεροξειδάση γλουταθειόνης, υπεροξειδική δισμουτάση, καταλάση κλπ), των αριθμό των λευκοκυττάρων, καθώς και τις συγκεντρώσεις βιταμίνης Ε και C της κυκλοφορίας (Brancaccio, Lippi, & Maffulli, 2010; Fisher-Wellman & Bloomer, 2009).

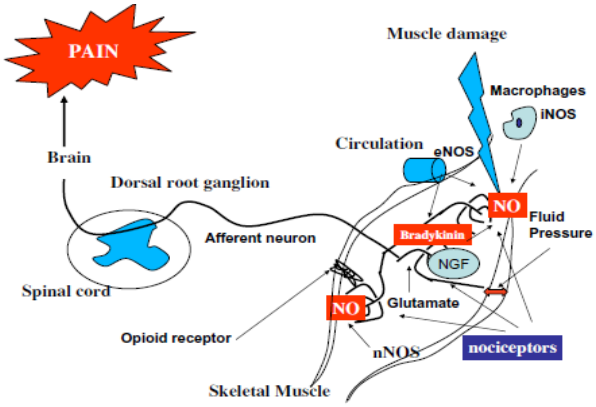
2.3.2. Έκκεντρη άσκηση και οξειδωτικό στρες

Η οξειδοαναγωγική ισορροπία μπορεί να προκληθεί τόσο με πρωτόκολλο αερόβιας όσο και αναερόβιας έκκεντρης άσκησης, με την πλειονότητα αυτών να επιλέγουν κατηφορικό τρέξιμο στην πρώτη περίπτωση, και έκκεντρες συστολές των καμπτήρων μυών του αγκώνα ή των εκτείνοντων του γονάτου, στη δεύτερη περίπτωση. Επιπροσθέτως, με ελάχιστες εξαιρέσεις στρατολογούνται απροπόνητα άτομα, ώστε να παραχθεί ο μέγιστος βαθμός βλάβης στους μυς. Έχει αναφερθεί ότι αυτά τα πρωτόκολλα καταλήγουν σε αυξημένη ΑΜΒ/καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης, συμπτώματα που συνοδεύονται από υψηλή CK, αυξημένη λιπιδική υπεροξείδωση, οξείδωση πρωτεϊνών και DNA, αλλαγές στην οξειδοαναγωγική κατάσταση της γλουταθειόνης. Οι τιμές φαίνονται να κορυφώνονται στις 48-72 ώρες μετά την άσκηση, παρόλα αυτά, υπάρχουν και πειράματα με παρόμοια πρωτόκολλα που δεν έχουν δείξει αντίστοιχα αποτελέσματα, γεγονός που μπορεί να οφείλεται σε αρκετούς παράγοντες. Οι πιο σημαντικοί από αυτούς, είναι η ανεπιτυχής προσπάθεια να προκαλέσει μυϊκή βλάβη το πρωτόκολλο άσκησης που επιλέγεται- το οποίο, βέβαια, επηρεάζεται, με τη σειρά του, από την ηλικία, την προπονητική κατάσταση, την διαιτητική πρόσληψη των εθελοντών- η μέτρηση δεικτών οξειδωτικού στρες από το μυϊκό ιστό και όχι από το αίμα, η ευαισθησία και εξειδίκευση των βιοδεικτών που ανιχνεύονται, καθώς και η χρονική στιγμή που γίνεται η δειγματοληψία (Fisher-Wellman & Bloomer, 2009). Είναι γεγονός ότι η πραγματοποίηση έκκεντρης άσκησης απαιτεί μεγάλη τάση στους μυς, αλλά χαμηλότερο ενεργειακό κόστος και κατανάλωση O_2. Συνεπώς, οι ελεύθερες ρίζες

που γεννούνται, δεν προέρχονται τόσο από την μιτοχονδριακή μεταφορά ηλεκτρονίων, όσο από από δευτερεύουσες πηγές, όπως τους φλεγμονώδεις παράγοντες. Αξίζει να τονιστεί ξανά, στο σημείο αυτό, ότι η ασκησιογενής μυϊκή βλάβη που επιφέρει η έκκεντρη άσκηση, οδηγεί σε προφλεγμονώδη μετανάστευση των φαγοκυττάρων στην κατεστραμένη περιοχή, κάτι που οδηγεί με τη σειρά του σε αύξηση απελευθέρωσης δραστικών ειδών οξυγόνου και αζώτου, ώστε αυτά να βοηθήσουν στην καταστροφή του τραυματισμένου ιστού (Εικόνα 2. 4)(Camus et al., 1994). Ειδικά η παραγωγή του μονοξειδίου του αζωτου (NO) έχει συνδεθεί με την πιθανή αιτιολογία του καθυστερημένου μυϊκού πόνου, πράγμα που προτάθηκε για πρώτη φορά από τον Radak και τους συνεργάτες του(Radak, Pucsok, Mecseki, Csont, & Ferdinandy, 1999). Το NO, παράγωγο της L-αργινίνης, δημιουργείται από τη συνθάση του NO (NOS) και υπάρχει σε τρεις ισομορφές στους σκελετικούς μυς (iNO, eNO, nNO). Το iNO από τα μακροφάγα, το eNO-ρυθμιζόμενο μέσω της αιματικής ροής- από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και το nNO που κωδικοποιείται στην δυστροφίνη και στο σύστημα Golgi, φαίνεται πως αποτελούν σημαντική αιτία της αίσθησης του πόνου (Εικόνα 2.5), της μείωσης της δύναμης, αλλά και της ενεργοποίησης των δορυφορικών κυττάρων (μέσω ελέγχου του σηματοδοτικού μονοπατιού της IGF-I/p70 κινάσης). Επιπροσθέτως, οι ισομορφές του NO που επάγονται από την άσκηση, και στην μεταγραφή των οποίων μεσολαβεί ο πυρηνικός παράγοντας-κB, φαίνεται πως παίζουν μεγάλο ρόλο στην επαγωγή της IL-6, της IL-8 και της HSP70(Radak et al., 2012).



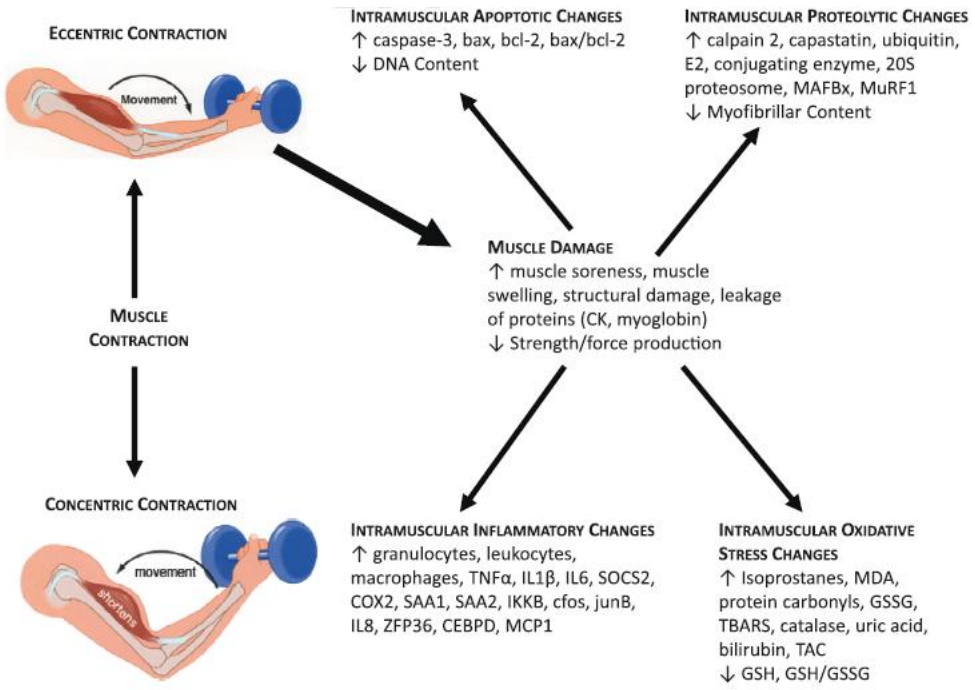
Εικόνα 2. 4: Η συμμετοχή των ελευθέρων ριζών μετά από έκκεντρη άσκηση που προκαλεί ΑΜΒ.



Εικόνα 2.5*:* Θεωρητικό μοντέλο κατά το οποίο οι αλγοϋποδοχείς και οπιοειδείς υποδοχείς ενεργοποιούνται από ποικίλους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της βραδυκινίνης, του ATP, του γλουταμινικού και των τριών ισομορφών του NO.(Radak, Naito, Taylor, & Goto, 2012)

Λαμβάνοντας υπόψη τα όσα σχολιάστηκαν σε επίπεδο παθοφυσιολογίας, μετά από έκκεντρη άσκηση, φαίνεται ότι η ΑΜΒ, και όποιες συνέπειες απορρέουν από αυτήν

(πχ καθυστερημένος μυϊκός πόνος, πρήξιμο, μείωση μέγιστης δύναμης) συνυφαίνεται τόσο με φλεγμονή όσο και με οξειδωτικό στρες. Το παρακάτω σχήμα (Εικόνα 2. 6) απεικονίζει επιγραμματικά όλες τις συνιστώσες που πιθανόν σχετίζονται με την AMB(C. M. Kerksick et al., 2013).



Εικόνα 2. 6 : Παράγοντες που σχετίζονται με την AMB(C. M. Kerksick, Willoughby, Kouretas, & Tsatsakis, 2013)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΣΚΗΣΙΟΓΕΝΗΣ ΜΥΪΚΗ ΒΛΑΒΗ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗ

3.1. Συμπληρώματα

3.1.1. Αντιοξειδωτικά ή/και αντιφλεγμονώδη διατροφικά συμπληρώματα

Ολοένα και περισσότερες διατροφικές παρεμβάσεις γίνονται τα τελευταία χρόνια, σκοπός των οποίων είναι η γρηγορότερη και αποτελεσματικότερη αποκατάσταση μετά από άσκηση που προκαλεί μυϊκή βλάβη. Οι πλειοψηφία των διατροφικών συμπληρωμάτων που έχουν δοκιμαστεί και εξακολουθούν να δοκιμάζονται είναι πλούσια σε αντιοξειδωτικά και αντιφλεγμονώδη συστατικά, των οποίων η δράση πιθανόν επηρεάζει τον πόνο, αλλά ίσως και τη μυοκυτταρική λειτουργία. Ιδιαίτερα δημοφιλή είναι, επίσης, στους αθλητές, μιας και το χρόνιο οξειδωτικό στρες, λόγω της υπερβολικής προπόνησής τους, έχει συνδεθεί με χρόνια κόπωση, μείωση στην απόδοση μακροπρόθεσμα και μυϊκή ατροφία(McLeay, Stannard, Houltham, & Starck, 2017). Τέλος, ο χώρος των διατροφικών συμπληρωμάτων κερδίζει έδαφος ακόμη και στους ερασιτεχνικά αθλούμενους, καθώς υπάρχει συχνά η πεποίθηση ότι η συνήθης δίαιτα είναι ανεπαρκής σε βιταμίνες και μέταλλα, ή ότι η αυξημένη άσκηση απαιτεί και μεγαλύτερη πρόσληψη σε μικροθρεπτικά, σε σχέση με την καθιστική ζωή. Ειναι σημαντικό να γίνει ξεκάθαρο, βέβαια, ότι το οξειδωτικό στρες δεν είναι η αιτία των χαρακτηριστικών συμπτωμάτων -απώλεια δύναμης, μείωση στο εύρος κίνησης, αυξημένη έκκριση κρεατινικής κινάσης- της ΑΜΒ, για αυτό και μια μείωση του οξειδωτικό στρες δεν θα αλλάξει την αρχική ΑΜΒ. Παρόλα αυτά μελετάται διεξοδικά πώς μπορεί να επιδράσει στην αποκατάσταση της λειτουργικότητας/απόδοσης των μυών μετά την μικρο-καταστροφή τους(Myburgh, 2014). Παρακάτω θα αναφερθούν τα διατροφικά συστατικά που πιθανόν επιδρούν στην ΑΜΒ.

3.1.1.1. Πολυφαινόλες

Τα φλαβονοειδή, η μεγαλύτερη κατηγορία των πολυφαινολών, φαίνεται να ασκούν αντιοξειδωτική δράση, παγιδεύοντας και απομακρύνοντας τις ελεύθερες ρίζες, εμποδίζοντας την παραγωγή τους, αναστέλλοντας την NADPH οξειδάση, την οξειδάση της ξανθίνης και τη μυελοϋπεροξειδάση. Επίσης, σχηματίζουν χηλικές ενώσεις με τα οξειδοαναγωγικά δραστικά μέταλλα, ενεργοποιούν αντιοξειδωτικά ένζυμα,

αναστέλλουν τη λιπιδική υπεροξείδωση και μειώνουν τις ρίζες της α-τοκοφερόλης (μία μορφή της βιταμίνης Ε). Προκειμένου να εξηγηθεί η αντιφλεγμονώδης επίδρασή τους έχουν προταθεί ορισμένοι μηχανισμοί, όπως η μείωση δραστικότητας των ενζύμων που μεταβολίζουν το αραχιδονικό οξύ (φωσφολιπάση Α2, κυκλοξυγονάση, λιποξυγονάση), η αναστολή της συνθάσης του ΝΟ (NOS), προφλεγμονωδών μορίων - συμπεριλαμβανομένων των IL-1b, IL-2, IL-6, TNF-a-και τέλος ρύθμιση στην προ-φλεγμονώδη έκφραση γονιδίων (Sousa, Teixeira, & Soares, 2014).

Ένα από τα φλαβονοειδή είναι η *κερκετίνη*, η οποία έχει χρησιμοποιηθεί σε αρκετές μελέτες ΑΜΒ ως διατροφικό συμπλήρωμα. Όμως αυτή δε φαίνεται να έχει θετική επίδραση ως προς τη μυϊκή δύναμη, τη μυϊκή καταστροφή και φλεγμονή, τις κυτταροκίνες του πλάσματος και τα ορμονικά επίπεδα, όπως θα ήταν αναμενόμενο (David C. Nieman et al., 2007; D. C. Nieman et al., 2007; O'Fallon et al., 2012).

Ένα ακόμη φλαβονοειδές είναι η *γαλλική επιγαλλοκατεχίνη*, μια κατεχίνη που συναντάται σε υψηλές συγκεντρώσεις στο πράσινο τσάι. Όταν χορηγήθηκε ως συμπλήρωμα σε έρευνα για τη μυϊκή βλάβη, επέφερε μείωση στον πόνο στην ομάδα παρέμβασης αλλά δεν βρέθηκαν διαφορές στους δείκτες φλεγμονής, συγκριτικά με την ομάδα που πήρε το εικονικό σκεύασμα(Chad M. Kerksick, Kreider, & Willoughby, 2010). Όσον αφορά την επίδραση της σε δείκτες οξειδωτικού στρες, μια πολύ πρόσφατη μελέτη (Panza et al., 2016) που χορήγησε τσάι στην ομάδα παρέμβασης πριν από έκκεντρη άσκηση, δεν βρήκε διαφορές, όμως φάνηκε πως επιταχύνθηκε η αποκατάσταση της μυϊκής δύναμης, μετά τις 24 ώρες. Αντίθετα, σε μια άλλη πρόσφατη μελέτη, που χορηγήθηκε τσάι –πράσινο και υβίσκου- σε επαγγελματίες ποδοσφαιριστές, ενώ είχε οφέλη στους βιοδείκτες οξειδωτικού στρες –ιδιαίτερα στη μελέτη του υβίσκου- δεν υπήρξε βελτίωση στους δείκτες μυϊκής βλάβης (Hadi et al., 2017).

Αξίζει να σημειωθεί, ότι στις περισσότερες μελέτες, τα μεμονωμένα φαινολικά συστατικά, χορηγούμενα με τη μορφή συμπληρωμάτων, φαίνεται να μην είχαν σπουδαία επίδραση στην ΑΜΒ και τον καθυστερημένο μυϊκό πόνο. Παρόλα αυτά, μελέτες που χορήγησαν κεράσια και βατόμουρα (Bowtell, Sumners, Dyer, Fox, & Mileva, 2011; D. A. J. Connolly, McHugh, & Padilla-Zakour, 2006; Howatson et al., 2012), τροφές πλούσιες σε αντιοξειδωτικά -μελατονίνη, καροτενοειδή, υδροξυκινναμωμικά άλατα και αρκετά φλαβονοειδή, συμπεριλαμβανομένων των ανθοκυανινών και της

κερκετίνης (McCune, Kubota, Stendell-Hollis, & Thomson, 2011)- είχαν θετικά αποτελέσματα οσον αναφορά στην αποκατάσταση της δύναμης, χωρίς παρόλα αυτά να βρίσκουν διαφορές στους δείκτες μυϊκής βλάβης των ομάδων παρέμβασης και τα αποτελέσματα του οξειδωτικού στρες και της φλεγμονής είχαν μεγάλη διακύμανση μεταξύ των μελετών αυτών (Sousa et al., 2014). Σε πρόσφατη ανασκόπηση (Bell, McHugh, Stevenson, & Howatson, 2014), μάλιστα, τα κεράσια προτάθηκαν ως εναλλακτική των μη συνταγογραφούμενων μη στερεοειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων ή αναλγητικών.

Παρόμοια αποτελέσματα με τα κεράσια έχει και το συμπλήρωμα ροδιού και του εκχυλίσματος του, ιδιαίτερα πλούσιο σε μια άλλη ομάδα πολυφαινολών, τις *ελλαγιταννίνες* (Trombold, Reinfeld, Casler, & Coyle, 2011).

3.1.1.2. Καροτενοειδή

Τα καροτενοειδή, που χωρίζονται σε δύο κύριες τάξεις, τα καροτένια και τις ξανθοφύλλες, και τα προσλαμβάνει κανείς κυρίως από τα φρούτα και τα λαχανικά, είναι επίσης μια ομάδα ενώσεων που έχουν μελετηθεί για πιθανή προστασία στο οξειδωτικό στρες. Τα πιο άφθονα καροτένια από διατροφικές πηγές είναι το β-καροτένιο και το λυκοπένιο, ενώ οι πιο κοινές ξανθοφύλλες είναι η λουτεΐνη, η β-κρυπτοξανθίνη, η ζεαξανθίνη και η ασταξανθίνη. Η αντιοξειδωτική δράση αυτών έγκειται στην ικανότητά τους να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες και να εμποδίζουν τη λιπιδική υποροξείδωση (Sousa et al., 2014). Μέχρι σήμερα όμως, μόνο μια μελέτη σε ανθρώπους υπάρχει (Djordjevic et al., 2012), στην οποία χρησιμοποιήθηκε ασταξανθίνη ως συμπλήρωμα. Φάνηκε να έχει θετική επίδραση στη κρεατινική κινάση και στη συνολική απόκριση των αντιοξειδωτικών ενζύμων, εξαιρουμένης της υποροξειδικής δισμουτάσης, μετά από έντονη άσκηση.

3.1.1.3. Α-λιποϊκό οξύ

Το Λιποϊκό οξύ, μπορεί να ληφθεί και από φυτικές αλλά κυρίως από ζωικές πηγές-όπως το κόκκινο κρέας, το συκώτι, την καρδιά και το νεφρό- ενώ παράγεται ενδογενώς μέσα από τη de novo σύνθεση από λιπαρά οξέα και κυστεΐνη. Η ανηγμένη του μορφή, γνωστή ως διυδρολιποϊκό οξύ (DHLA), είναι αυτή που αλληλεπιδρά με τα δραστικά είδη οξυγόνου, όμως και η οξειδωμένη του μορφή μπορεί να αδρανοποιήσει

τις ελεύθερες ρίζες. Επίσης, και οι δύο μορφές λειτουργούν ως χηλικοί υποκαταστάσεις για τα μέταλλα. Το DHLA έχει τη δυνατότητα να ανάγει την οξειδωμένη μορφή σημαντικών αντιοξειδωτικών, όπως της βιταμίνης C και E, του συνενζύμου Q10 και της γλουταθειόνης(Sousa et al., 2014). Για τους παραπάνω λόγους αυτό το οξειδοαναγωγικό ζευγάρι LA/DHLA έχει αναγνωριστεί ως ένα από τα πιο ισχυρά αντιοξειδωτικά /συστήματα (Djordjevic et al., 2012). Σε δύο μελέτες των ερευνητών Zembron-Lacny(Zembron-Lacny, Ostapiuk, & Szyszka, 2009; Zembron-Lacny, Slowinska-Lisowska, et al., 2009) το συμπλήρωμα LA δεν έδειξε διαφορές όσον αφορά στη μυϊκή βλάβη (κρεατινική κινάση και γαλακτική αφυδρογονάση), επηρέασε όμως θετικά τα επίπεδα γλουταθείονης, αναγωγάσης και υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης, μετά την άσκηση, καθώς και τις συνολικές θειόλες, τα πρωτεϊνικά καρβονύλια, το θειοβαρβιτουρικό οξύ και το ουρικό οξύ. Σε μια τελευταία έρευνα (Fogarty et al., 2013), η συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα μετά από άσκηση βρέθηκε βελτιωμένη στην ομάδα παρέμβασης.

3.1.1.4. Συνέζυμο Q-10

Το συνένζυμο Q, η αλλιώς ουβικινόνη, είναι μια λιπόφιλη ένωση που παρίσταται άφθονη σε όλα τα ζωντανά κύτταρα. Εκτός βέβαια από την ενδογενή σύνθεση, το κρέας, το ψάρι, οι ξηροί καρποί και ορισμένα φυτικά έλαια είναι πλούσιες διατροφικές πηγές του συνενζύμου Q10. Εκτός από τον σημαντικό του ρόλο στην μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα, η ανηγμένη του μορφή, κυρίως, θεωρείται αποτελεσματικό αντιοξειδωτικό, μιας και προστατεύει από τη λιπιδική υπεροξείδωση, την οξείδωση του DNA και των πρωτεϊνών, και βοηθά στην αναγέννηση των βιταμινών C και E(Sousa et al., 2014). Στις μελέτες που χορηγήθηκε ως αντιοξειδωτικό, σε κάποιες φαίνεται να έχει κάποια δράση ως προς τη μείωση του οξειδωτικού στρες, μετά την άσκηση (Diaz-Castro et al., 2012) (Kon et al., 2008), σε άλλες όχι (Kim & Lee, 2014; Malm, Svensson, Sjoberg, Ekblom, & Sjodin, 1996; Ostman, Sjodin, Michaelsson, & Byberg, 2012)

3.1.1.5. ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα

Τα ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, στα οποία ανήκουν τα ω-3 εικοσαπεντανοϊκό (EPA) και δεκαεξανοϊκό οξύ (DHA), είναι άρρικτα συνδεδεμένα με αντιφλεγμονώδεις και ανοσορυθμιστικές ιδιότητες. Πιο συγκεκριμένα, η πρόσληψη ω-

3 λιπαρών οξέων φαίνεται να επιδρά στην φαγοκυττάρωση, τη σηματοδότηση των Τ-κυττάρων και στην παρουσία αντιγόνων, με αποτέλεσμα την μείωση της παραγωγής κυτταροκινών και δραστικών ειδών οξυγόνου. Συνεπώς τα ω-3 θα μπορούσαν να λετουργούν σαν ένας διατροφικός αρωγός στην ασκησιογενή φλεγμονή και οξειδωτικό στρες. Πλούσιες διατροφικές πηγές αυτών είναι τα λιπαρά ψάρια, όπως ο σολωμός, ο τόνος, το σκουμπρί, οι ξηροί καρποί και το ιχθυέλαιο. Σε πρωτόκολλα ασκησιογενούς μυϊκής βλάβης, η συμπληρωματική χορήγηση ω-3 λιπαρών οξέων, ίσως σχετίζεται περισσότερο με θετική επίδραση στην φλεγμονή παρά στο οξειδωτικό στρες (Sousa et al., 2014). Σε αρκετά, φάνηκε πως μείωσε τον καθυστερημένο μυϊκό πόνο, πιθανόν λόγω της ικανότητας των ω-3 λιπαρών οξέων να αυξάνουν τη ροή του αίματος. Για αυτό το λόγο, συστήνεται συχνά σε αθλούμενους και αθλητές, παρόλα αυτά είναι δύσκολο να προταθεί μια συγκεκριμένη βέλτιστη δοσολογία και χρονική στιγμή της πρόσληψής τους. Γενικά, μια δόση ίση ή μικρότερη των 3 γραμμαρίων ανά ημέρα θεωρείται ασφαλής για τον γενικό πληθυσμό και, όσον αφορά στους αθλητές, ο παγκόσμιος οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) συστίνει να μην υπερβούν αυτή τη δοσολογία με τη χρήση συμπληρωμάτων(Mickleborough, 2013), προκειμένου να μην βρεθούν σε κίνδυνο αιμορραγίας και ανοσοκαταστολής(Ryan et al., 2009) ή/και αύξηση της LDL χοληστερόλης (Kris-Etherton, Grieger, & Etherton). Τέλος, ο Simopoulos και οι συνεργάτες του έχουν προτείνει μια αναλογία 2:1 EPA:DHA, που μπορεί να είναι ωφέλιμη για τους αθλητές(Simopoulos, 2007).

Στο σημείο αυτό, παρόλα αυτά, αξίζει να αναφερθούν και ορισμένα μειονεκτήματα των ιχθυελαίων, που είναι από τα πιο δημοφιλή συμπληρώματα ω-3 λιπαρών οξέων. Είναι γνωστό ότι μερικά είδη ψαριών είναι επιβαρυμένα με τοξίνες, όπως είναι βαρέα μέταλλα, διοξίνες και πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCBs), οι οποίες παραμένουν και στα αντίστοιχα ιχθυέλαια, όταν σε αυτά δε γίνεται μοριακή απόσταξη. Επιπροσθέτως, τα ιχθυέλαια προκαλούν συχνά πεπτικά προβλήματα, όπως φούσκωμα, γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση, ναυτία και η «γεύση ψαριού» που τυχόν έχει μπορεί να προκαλεί δυσαρέσκεια(Mickleborough, 2013).

3.1.1.6. Ταυρίνη

Η ταυρίνη είναι ένα οργανικό οξύ που βρίσκεται στους σκελετικούς μυς και έχει πολλές βιολογικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένης της σταθεροποίησης των

μεμβρανών, της αντιοξειδωτικής ικανότητας, τη ρύθμιση της όσμωσης και της ομοιόστασης του ασβεστίου(Kim & Lee, 2014). Στις μελέτες που χορηγήθηκε ως συμπλήρωμα, είτε μόνη της(L. A. Silva et al., 2011), είτε σε συνδυασμό με BCAA(Ra et al., 2013), φάνηκε ότι μείωσε τον καθυστερημένο μυϊκό πόνο μετά την άσκηση και επηρεάσε θετικά τους δείκτες οξειδωτικού στρες, αλλά όχι τους δείκτες φλεγμονής.

3.1.1.7. Καφεΐνη

Η καφεΐνη, επιπλέον, έχει σχετιστεί σε δύο μελέτες με μείωση του καθυστερημένου μυϊκού πόνου μετά από άσκηση, γεγονός που φαίνεται να οφείλεται σε απενεργοποίηση του κεντρικού νευρικού συστήματος. Ο προτεινόμενος μηχανισμός για τη δράση αυτή, βασίζεται στην ικανότητα της καφεΐνης να παρεμποδίζει τον υποδοχέα της αδενοσίνης, καθώς λειτουργεί ως ανταγωνιστής της αδενοσίνης(Hurley, Hatfield, & Riebe, 2013; Maridakis, O'Connor, Dudley, & McCully, 2007).

3.1.1.8. βιταμίνη C ή/και E

Η βιταμίνη C, ή αλλιώς το ασκορβικό οξύ, μια υδατοδιαλυτή βιταμίνη, βρίσκεται στο κυττοσόλιο των κυττάρων. Οι πλέον πλούσιες διατροφικές πηγές της βιταμίνης C είναι κυρίως τα εσπεριδοειδή φρούτα αλλά εξίσου καλή είναι και οι γλυκές πιπεριές, οι φράουλες, τα κραμβοειδή και πράσσινα φυλλώδη λαχανικά. Η δράση της ασκείται μέσω δέσμευσης των δραστικών ειδών οξυγόνου και αζώτου, καθώς επίσης και αναγεννώντας άλλα αντιοξειδωτικά μόρια –από την οξειδωμένη τους μορφή- όπως τη βιταμίνη E, το β-καροτένιο και τη γλουταθειόνη. Όσον αφορά στην βιταμίνη E, είναι η πιο σημαντική λιποδιαλυτή αντιοξειδωτική βιταμίνη και απαντάται φυσικά σε όλες τις μεμβράνες των κυττάρων. Η βασικότερη διατροφική πηγή της είναι τα φυτικά έλαια, και ιδιαίτερα το ηλιέλαιο, το λάδι κνήκου και τα καρύδια. Υπάρχει σε οκτώ διαφορετικά ισομερή, με την περισσότερο βιολογικά ενεργή μορφή να είναι η α-τοκοφερόλη, γνωστή για την ικανότητα της να σταματά την αλυσιδωτή αντίδραση της λιπιδικής υπεροξείδωσης και να δεσμεύει τις ρίζες υπεροξειδίου, υδροξυλίου και τα υπεροξειδικά λιπίδια(McLeay et al., 2017).

Μια πολύ εκτενής ανασκόπηση(McGinley, 2009 #319)για την επίδραση των δύο αυτών συμπληρωμάτων, μεμονωμένα ή συνδυαστικά, καταλήγει στο ότι λίγες είναι οι ενδείξεις που υποστηρίζουν την προστασία τους στην μυϊκή βλάβη, όμως και οι δύο

φαίνεται να μειώνουν τους δείκτες του οξειδωτικού στρες. Οι μελέτες μετά από αυτή την ανασκόπηση, εξακολουθούν να δείχνουν αντιφατικά αποτελέσματα, με κάποιες να δείχνουν θετική επίδραση των συμπληρωμάτων στον μυϊκό πόνο(Luciano A. Silva et al., 2009), στην μυϊκή καταστροφή -μέσω των μετρήσεων LDH(Luciano A. Silva et al., 2009) και CK(Nakhostin-Roohi, Babaei, Rahmani-Nia, & Bohlooli, 2008)-, στη φλεγμονή(Luciano A. Silva et al., 2009) και στο οξειδωτικό στρες(Nakhostin-Roohi et al., 2008) και άλλες καμία επίδραση στη μυϊκή καταστροφή- χρησιμοποιώντας ως δείκτη τη CK-, στον μυϊκό πόνο, στο συνολικό οξειδωτικό προφίλ, στη μυϊκή λειτουργία -χρησιμοποιώντας τη μέγιστη ισομετρική δύναμη-(Theodorou et al., 2011) και στη φλεγμονή(Nakhostin-Roohi et al., 2008).

Τέλος, σε υψηλά επίπεδα, τα εξωγενή αντιοξειδωτικά μπορεί να προάγουν την οξείδωση, καταλήγοντας τελικά σε μείωση της απόδοσης κατά την άσκηση. Αναφερόμενοι στη βιταμίνη C, αντιδρά με μεταλλικά ιόντα τα οποία έχουν προέλθει από την ασκησιογενή καταστροφή του μυϊκού ιστού, γεννώντας βλαβερές υδροξυλικές ρίζες(Halliwell, 1996). Αντίστοιχα, η βιταμίνη E μπορεί να γίνει η ίδια ελεύθερη ρίζα όταν αντιδρά με μια άλλη ελεύθερη ρίζα και να καταστρέψει τελικά τις λιπιδικές μεμβράνες, αν δεν ξαναμετατραπεί στην ανηγμένη της μορφή(Chapman, Kim, & Min, 2009).

3.1.1.9. Άλλες διατροφικές παρεμβάσεις

Έχουν πραματοποιηθεί και κάποιες άλλες διατροφικές παρεμβάσεις, μια για το κάθε ένα από τα παρακάτω συστατικά, ωστόσο είναι αρκετά νωρίς για να βγει ασφαλές συμπέρασμα. Σε μία μελέτη που χορηγήθηκε συμπλήρωμα *αλισίνης* (Su, Tian, Zhang, & Zhang, 2008)-θειούχα ουσία και βασικό συστατικό του σκόρδου-, καθώς και σε μία που χορηγήθηκε συμπλήρωμα *πάναξ τζίνσενγκ* (Pumpa, Fallon, Bensoussan, & Papalia, 2013)-βότανο πλούσιο σε σαπωνίνες που πήρε το όνομα του από το αρχαιοελληνικό «πάναξ», καθότι θεωρούνταν πανάκεια για πολλά προβλήματα(Patel & Rauf, 2017)- ο καθυστερημένος μυϊκός πόνος και κάποιοι δείκτες φλεγμονής και οξειδωτικού στρες μειώθηκαν, μετά από έκκεντρη άσκηση. Τέλος, μια πολύ πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι οι δείκτες ασκησιογενούς μυϊκής βλάβης βελτιώθηκαν με τη χορήγηση *βόειου πρωτογάλακτος*, ενός συμπληρώματος πλούσιου σε αντιμικροβιακούς,

ανοσορυθμιστικούς και αναβολικούς παράγοντες, αντιοξειδωτικά ένζυμα και βιταμίνες, ιχνοστοιχεία με κυριότερο το σελήνιο, το χαλκό και τον ψευδάργυρο(Kotsis et al., 2017).

Συμπερασματικά, αναφορικά με τα αντιοξειδωτικά συμπληρώματα, η ακριβής ποσότητα των εξωγενών αντιοξειδωτικών που μπορεί να φέρει την κατάλληλη «ισορροπία» στα επίπεδα των ελεύθερων ριζών και να βελτιστοποιήσει την απόδοση, χωρίς ταυτόχρονα να είναι επιζήμια για τις προσαρμογές της άσκησης, είναι προς το παρόν άγνωστη. Μπορεί, δηλαδή, αυξημένη πρόσληψη να επιδράσει αρνητικά στην αναρρύθμιση της ενδογενούς αντιοξειδωτικής άμυνας, στην πρωτεϊνοσύνθεση, στην μιτοχονδριακή βιογένεση(McLeay et al., 2017), ακόμα και στην ινσουλινοευαισθησία(Espinosa et al., 2016), προσαρμογές οι οποίες είναι σημαντικές και για τη βελτίωση των δυνατοτήτων κατά την άσκηση αλλά και για την μετέπειτα ανάρρωση. Όλα τα παραπάνω συμβαίνουν καθότι επηρεάζονται ποικίλλα κυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια, αφού δεν γίνεται επιλεκτική σάρωση των ελεύθερων ριζών, αλλά όλων, ανεξαρτήτως προέλευσης(McLeay et al., 2017). Πιστεύεται, συνεπώς, ότι η χορήγηση αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων μπορεί να είναι τελέσφορη για την απόδοση, μόνο όταν τα ενδογενή επίπεδα έχουν εξαντληθεί. Από τη στιγμή που θα επιτευχθούν φυσιολογικές συγκεντρώσεις, δεν προσφέρουν περαιτέρω όφελος(Buzina & Suboticanec, 1985).

3.1.2. Συμπληρώματα υδατανθράκων / πρωτεϊνών

Η έρευνα πάνω στην αντιμετώπιση της ΑΜΒ, όσον αφορά στο διατροφικό τομέα, έχει εξετάσει ενδελεχώς την χρήση συμπληρωμάτων υδατανθράκων με ή χωρίς ταυτόχρονη λήψη πρωτεϊνών.

Η λογική πίσω από τις συγκεκριμένες παρεμβάσεις είναι ότι η λήψη υδατανθράκων θα προκαλέσει αύξηση στα επίπεδα της ινσουλίνης συνεπώς θα προωθηθεί η πρωτεϊνοσύνθεση στη φάση ανάρρωσης των μυών. Επιπλέον, η αυξημένη παρουσία αμινοξέων, με την ταυτόχρονη λήψη των δύο μακροθρεπτικών, μπορεί και να περιορίσει την πρωτεϊνική αποικοδόμηση, κατά τη δεύτερη φάση της ΑΜΒ, και να βοηθήσει την πρωτεϊνοσύνθεση παράλληλα (Cockburn, Stevenson, Hayes, Robson-Ansley, & Howatson, 2010).

Οι διατροφικές παρεμβάσεις με συμπληρώματα υδατανθράκων, παρόλα αυτά, φαίνεται να έχουν πολύ μικρή επίδραση(Howatson & van Someren, 2008). Περισσότερο θετική για τον ρυθμό ανάρρωσης από την ΑΜΒ, δείχνει να είναι η επίδραση των υδατανθρακικών συμπληρωμάτων με πρωτεΐνη(Mitchell, 2013; Sousa et al., 2014) και μάλιστα έχει προταθεί, για την πρώιμη φάση ανάρρωσης, μια ποσότητα των 0.8–1.2 g υδατάνθρακα/kg/h και 0.2–0.4 γρ πρωτεΐνης/kg/h, με ελάχιστη ποσότητα τα 20 γρ. πρωτεΐνης και κυρίως απαραίτητων αμινοξέων.

Έχουν γίνει αρκετές μελέτες, τέλος, με χορήγηση μόνο πρωτεΐνης, εφόσον είναι ευρέως αποδεκτό ότι ένα θετικό ισοζύγιο πρωτεΐνης είναι απαραίτητο για να επιταχύνει την μυϊκή ανάρρωση μετά από ΑΜΒ(Hawley, Tipton, & Millard-Stafford, 2006). Για την διέγερση της πρωτεΐνοσύνθεσης φαίνεται να είναι υπεύθυνα, κυρίως, τα απαραίτητα αμινοξέα, όπως προαναφέρθηκε, με τη λευκίνη να είναι βασικός ρυθμιστής του πρωτεϊνικού μεταβολισμού(Crozier, Kimball, Emmert, Anthony, & Jefferson, 2005). Τα 20 γρ. πρωτεΐνης αντιστοιχούν σε περίπου 8,5 γρ. απαραίτητων αμινοξέων και 1,5 γρ. λευκίνης, κατάλληλο ποσό για να βελτιστοποιηθεί η πρωτεϊνοσύνθεση(Phillips, 2010). Οι περισσότερες μελέτες που έχουν εξετάσει την επίδραση των πρωτεϊνών στην ΑΜΒ, και έχουν δει θετικά αποτελέσματα στα συμπτώματα αυτής, με κριτήριο την κρεατινική κινάση, τη γαλακτική αφυδρογονάση, τον καθυστερημένο μυϊκό πόνο αλλά και το πόσο επιταχύνεται η διαδικασία ανάκτησης της μυϊκής λειτουργίας, έχουν χρησιμοποιήσει ως συμπλήρωμα, αμινοξέα διακλαδισμένης αλύσου (BCAA) (Sousa et al., 2014).

3.2. Διατροφή

Αξίζει να σχολιαστεί, ότι μέχρι στιγμής οι περισσότερες παρεμβάσεις στην ΑΜΒ γίνονται με χορήγηση συμπληρωμάτων, όμως ολοένα και περισσότερες έρευνες, τελευταία, εστιάζουν στη θετική επιρροή συγκεκριμένων τροφών, οι οποίες είναι πλούσιες στα συστατικά που σχολιάστηκαν παραπάνω. Παρόλο, που ο αριθμός των μελετών αυτών δεν είναι μεγάλος και η μεθοδολογία διαφορετική, τα αποτελέσματά τους δείχνουν πως η υιοθέτηση διατροφικών προτύπων μπορεί, πράγματι, σε κάποιες περιπτώσεις, να είναι μια ευνοϊκή επιλογή για την μυϊκή ανάρρωση από την ΑΜΒ. Στα πλαίσια αυτά, λοιπόν, τόσο οι γυμναζόμενοι όσο και οι επαγγελματικά αθλούμενοι, θα

μπορούσαν να ϋοθετήσουν διατροφικά πρότυπα τέτοια ώστε να μην χρειάζεται να βασίζονται σε συμπληρώματα. Πιο συγκεκριμένα, μια αποτελεσματική διατροφή για την ΑΜΒ, η οποία δηλαδή εξασφαλίζει επάρκεια σε όλα τα θρεπτικά που αναφέρθηκαν, μπορεί να περιέχει γάλα- καλή πηγή πρωτεΐνης, λιπιδίων, αμινοξέων διακλαδισμένης αλύσου, βιταμινών και μετάλλων-, ψάρι και ιδιαίτερα λιπαρά ψάρια- πηγή πρωτεΐνης υψηλής βιολογικής αξίας, λιποϊκού οξέος, συνενζύμου Q-10 και ω-3 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων-, τσάι, καθώς και φρούτα πλούσια σε φυτοχημικά όπως τα μούρα, το ρόδι, τα κεράσια. Το αν η θετική επίδραση των συγκεκριμένων φρούτων οφείλεται στη δράση των αντιοξειδωτικών των φαινολικών τους ενώσεων ή/και στη δράση από τα καροτενοειδή ή το ασκορβικό οξύ είναι ένα σημείο που δεν έχει ξεκαθαριστεί. Άλλες διατροφικές επιλογές, που έχουν μελετηθεί στο πλαίσιο της μυϊκής βλάβης και φλεγμονής αλλά όχι προερχόμενης από άσκηση, και οι οποίες θα μπορούσαν, πιθανόν, να συντελέσουν στην μυϊκή ανάρρωση είναι τα αυγά, το κόκκινο κρέας (μοσχάρι), οι ξηροί καρποί και η υψηλής βιολογικής αξίας πρωτεΐνη από φασόλια σόγιας(Sousa et al., 2014).

Β' ΕΝΟΤΗΤΑ : ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΚΟΠΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία ανήκει στη γενικότερη προσπάθεια ανάπτυξης ενός πρωτοκόλλου ασκησιογενούς μυικής βλάβης που θα μπορούσε να λειτουργήσει ως μοντέλο φλεγμονής και οξειδωτικού στρες σε ανθρώπους και να βρει εφαρμογή στο γενικό πληθυσμό. Ειδικότερα, στην εργασία αυτή εφαρμόστηκαν δύο πρωτόκολλα έκκεντρης άσκησης στα κάτω και άνω άκρα με σκοπό να αναζητηθούν διαφορές στην απόκριση δεικτών ΑΜΒ, φλεγμονής και οξειδωτικού στρες ώστε να επιλεγεί τελικά το πρωτόκολλο άσκησης που επιφέρει τις μεγαλύτερες αλλαγές. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να γίνει σύγκριση στην απόκριση της δραστικότητας τριών αντιοξειδωτικών ενζύμων (υπεροξειδική διμουτάση ορού, υπεροξειδική διμουτάση λευκοκυττάρων και υπεροξειδάση της γλουταθειόνης ορού) μεταξύ των δύο πρωτοκόλλων έκκεντρης άσκησης στα άνω και κάτω άκρα υγειών, αγύμναστων εθελοντών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

5.1 Γενικό ερευνητικό πρωτόκολλο

5.1.1 Δοκιμαζόμενοι έρευνας-Κριτήρια επιλογής

Το δείγμα της κύριας έρευνας αποτέλεσαν 5 νέα ενήλικα άτομα (3 γυναίκες και 2 άντρες), ύστερα από πρόσκληση για εθελοντική συμμετοχή. Προϋποθέσεις για την συμμετοχή τους στην έρευνα ήταν:

α) Να μην εμπλέκονται σε έντονη αερόβια προπόνηση περισσότερο από μία φορά την εβδομάδα ή προπόνηση αντίστασης με τα άνω και κάτω άκρα, για ένα διάστημα τουλάχιστον 6 μηνών πριν από την έναρξη της έρευνας,

β) Να μην αντιμετωπίζουν κάποιο ορθοπεδικό πρόβλημα, τραυματισμό ή καρδιολογικό πρόβλημα, αλλά ούτε κάποια ασθένεια, λοίμωξη ή φλεγμονή τις τελευταίες τουλάχιστον 3 εβδομάδες πριν την έναρξη της έρευνας και,

γ) Οι γυναίκες να μην αντιμετωπίζουν ορμονικά προβλήματα.

Από όλους τους δοκιμαζόμενους ζητήθηκε, κατά την διάρκεια της συμμετοχής τους στην έρευνα, να αποφύγουν να χρησιμοποιήσουν οποιοδήποτε αντιφλεγμονώδες ή αναλγητικό φάρμακο, να μην κάνουν υδροθεραπεία, μασάζ ή διατάσεις προκειμένου να ανακουφιστούν από το μυϊκό «πιάσιμο» που θα αντιμετώπιζαν, και να μην συμμετάσχουν σε κανένα πρόγραμμα σωματικής άσκησης. Επιπλέον, σε όλους τους συμμετέχοντες δόθηκε η οδηγία να μην ξεκινήσουν οποιοδήποτε είδος δίαιτας, να διατηρήσουν τις διατροφικές τους συνήθειες, καθώς και να μην καταναλώσουν οινοπνευματώδη ποτά, ούτε κάποιο συμπλήρωμα διατροφής κατά το χρονικό διάστημα της συμμετοχής τους στην έρευνα. Έχοντας λάβει όλες τις απαραίτητες πληροφορίες, προφορικώς και γραπτώς, σχετικά με τους σκοπούς και τις διαδικασίες της έρευνας, οι δοκιμαζόμενοι υπέγραψαν ειδικό έντυπο συγκατάθεσης. Επισημάνθηκε ότι η μη συνεπής τήρηση των οδηγιών και των περιορισμών που τους δόθηκαν συνιστούσε αιτία αποκλεισμού από τις διαδικασίες της έρευνας και έγινε παράκληση για τη συνεπή τήρηση των συστάσεων που τους έγιναν. Το πρωτόκολλο της μελέτης έχει λάβει συγκατάθεση από την Επιτροπή Βιοηθικής του Χαροκοπείου Πανεπιστήμιου.

5.1.2 Πορεία πειράματος

Η προσέλευση των εθελοντών γινόταν νωρίς το πρωί μετά από 12ωρη νηστεία. Μετά από λιπομέτρηση με τη μέθοδο βιοηλεκτρικής εμπέδησης, αιμοληψία και παραλαβή σάλιου (baseline), τους δινόταν πρωινό. Το πρωινό αποτελείτο από 2 φέτες λευκό ψωμί του τοστ, 1 φέτα κίτρινο τυρί, 1 φέτα βραστή γαλοπούλα και 1 μπανάνα (120 γρ). Μία ώρα μετά την έναρξη του γεύματος, επαναλαμβανόταν η λιπομέτρηση, η αιμοληψία και η παραλαβή σάλιου (pre-exercise). Αμέσως μετά ακολουθούσε το πρωτόκολλο άσκησης, είτε στο χέρι έιτε στο πόδι, με την ολοκλήρωση του οποίου γινόταν η παραπάνω διαδικασία λιπομέτρησης, αιμοληψίας και παραλαβής σάλιου για 3^{η} φορά (post-exercise). Οι παραπάνω μετρήσεις γίνονταν επίσης στο 2ωρο στο 24ωρο και στο 48ωρο μετά την άσκηση. Σε όλες αυτές τις χρονικές στιγμές (baseline,pre,post,2,24,48) γίνονταν, επίσης, και εργομετρικές αξιολογήσεις (SQJ, CMJ, μέτρηση εύρους κίνησης) και μέτρηση περιμέτρου του αντίστοιχου άκρου καθώς και εκτίμηση του καθυστερημένου μυικού πόνου.

5.2 Πρωτόκολλα άσκησης πρόκλησης ΑΜΒ

5.2.1 Άσκηση άνω άκρων

Προκειμένου να προκληθεί στους δοκιμαζόμενους ασκησιογενής μυϊκή βλάβη στο δικέφαλο μυ των χεριών, τους ζητήθηκε, μετά από ολιγόλεπτη προθέρμανση, να ακολουθήσουν συγκεκριμένο πρωτόκολλο άσκησης, το οποίο περιλάμβανε 80 μέγιστες έκκεντρες μυϊκές συστολές (8 σετ των 10 επαναλήψεων) των δικεφάλων. Ο δοκιμαζόμενος καλούνταν να αντισταθεί με όλη του τη δύναμη σε βάρος που αντιστοιχούσε στο 90% της μέγιστης δύναμής του, η οποία εξανάγκαζε τελικά το «άνοιγμα» της άρθρωσης του αγκώνα.

Πιο συγκεκριμένα, οι βραχίονες και οι αγκώνες του εθελοντή ακουμπούσαν σε μαξιλάρι δικεφάλων ενώ η αρχική θέση των χεριών σχημάτιζε οξεία γωνία με τους ώμους. Δινόταν στον εθελοντή η κατάλληλου βάρους μπάρα και στη συνέχεια τέντωνε τα χέρια με σταθερό και αργό ρυθμό, κρατώντας τη με ύπτια λαβή παλαμών, πραγματοποιώντας μια πλήρη έκταση, δηλαδή έως ότου τεντώσουν τα χέρια στην ευθεία του μαξιλαριού. Στη συνέχεια, τα χέρια του εθελοντή επέστρεφαν στην αρχική θέση και του ξαναδινόταν η μπάρα για την πραγματοποίηση της επόμενης έκκεντρης συστολής. Μετά την ολοκλήρωση κάθε σετ των 10 επαναλήψεων, παρείχετο στον δοκιμαζόμενο 1 λεπτό ξεκούρασης μέχρι και το 8^{ο} και τελευταίο σετ.

5.2.2 Άσκηση κάτω άκρων

Για την πρόκληση ασκησιογενούς μυϊκής βλάβης στο κάτω μέρος του σώματος, οι εθελοντές εκτέλεσαν 100 άλματα μετά από πτώση (10 σετ των 10 επαναλήψεων) από ένα ύψος 40 cm. Οι δοκιμαζόμενοι ανέβαιναν σε βάθρο ύψους 40 cm με διαφορετικό πόδι κάθε φορά, έκαναν μία πτώση, χωρίς αναπήδηση, στο έδαφος και στη συνέχεια ένα ημικάθισμα γύρω στις 90°. Ανάμεσα στις 10 επαναλήψεις, που πραγματοποιούνταν με σταθερό ρυθμό και μετά από ηχητικό σήμα, δεν υπήρχε διάλειμμα, ενώ ανάμεσα σε κάθε σετ παρείχετο 1 λεπτό ξεκούρασης.

Να σημειωθεί, τέλος, πως προκειμένου να αποφευχθούν ανεπιθύμητοι τραυματισμοί λόγω μη έγκαιρης ετοιμότητας του δοκιμαζομένου, η έναρξη κάθε επανάληψης γινόταν πάντοτε με την τελική απόφαση να ανήκει στον δοκιμαζόμενο.

5.3 Μετρήσεις

5.3.1 Ανθρωπομετρία

5.3.1.1 Μέτρηση Ύψους και Βάρους

Το σωματικό βάρος των εθελοντών μετρήθηκε με ελαφριά ένδυση και χωρίς υποδήματα, σε ηλεκτρονικό ζυγό ακριβείας (Seca, Αμβούργο, Γερμανία) και με ακρίβεια 0,1kg. Το ύψος μετρήθηκε με τη χρήση εντοιχισμένου αναστημόμετρου (Seca, Αμβούργο, Γερμανία) και με ακρίβεια 0,5cm. Επίσης υπολογίστηκε ο ΔΜΣ ως το πηλίκο του βάρους (σε kg) προς το τετράγωνο του ύψους (σε m) κάθε εθελοντή.

5.3.1.2 Σύσταση σώματος

Η σύσταση του σώματος προσδιορίστηκε περίπου μία εβδομάδα πριν από την έναρξη της μελέτης για κάθε εθελοντή ξεχωριστά, με τη μέθοδο της απορροφησιομετρίας ακτίνων Χ διπλής ενέργειας (dual-energy X-ray absorptiometry, DXA), χρησιμοποιώντας των σαρωτή σώματος (model DPX, Lunar Corp., Madison, WI, software version 3.6), του τμήματος επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου. Η ανάλυση του ολικού σώματος έγινε σε μέτρια ταχύτητα σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Πριν τη διαδικασία της σάρωσης οι εθελοντές αφαίρεσαν τα μεταλλικά αντικείμενα που έφεραν, ώστε να μην επηρεαστεί η μέτρηση. Ο προσδιορισμός της λιπώδους και άλιπης μάζας σώματος καθώς και της οστικής πυκνότητας έγινε με κατάλληλο λογισμικό πρόγραμμα που προτείνει ο κατασκευαστής. Ο συνολικός χρόνος σάρωσης έχει διάρκεια περίπου 20 λεπτά. Οι εθελοντές προσήλθαν για τη μέτρηση αυτή χωρίς να έχουν καταναλώσει φαγητό ή μεγάλη ποσότητα υγρών τις προηγούμενες τρεις ώρες.

5.3.2 Εκτίμηση φυσικής δραστηριότητας

Για την αξιολόγηση της φυσικής δραστηριότητας των φαινομενικά υγιών εθελοντών που συμμετείχαν χρησιμοποιήθηκε ερωτηματολόγιο IPAQ (International Physical Activity Questionnaire)(Hagstromer, Oja, & Sjostrom, 2006), που περιλαμβάνει ερωτήσεις σχετικά με τη συχνότητα και τη διάρκεια έντονων και μετρίας έντασης δραστηριοτήτων καθώς και το χρόνο περπατήματος και καθιστικών δραστηριοτήτων. Η φυσική δραστηριότητα και η ενεργειακή δαπάνη αξιολογήθηκαν από το σύνολο των

δραστηριοτήτων των εθελοντών μετά από αναγωγή τους ανά ημέρα και αντιστοίχηση των δραστηριοτήτων με τιμές Μεταβολικών Ισοδυνάμων (MET). (Ainsworth et al., 2000; Trichopoulou et al., 2001)

Στο σημείο αυτο σημειώνεται ότι το 1 MET αντιπροσωπεύει το μεταβολικό ρυθμό ηρεμίας. Η ένταση κάθε φυσικής δραστηριότητας μπορεί να εκφραστεί ως πολλαπλάσιο του MET, π.χ για το αργό περπάτημα 3,3 MET, για δραστηριότητες μέτριας έντασης (πχ μεταφορά βάρους, ποδηλασίας) 4,0 MET, και για έντονες δραστηριότητες (πχ άρση βαρών, σκάψιμο, αεροβική γυμναστική) 8,8 MET. Για την ποσοτικοποίηση της φυσικής δραστηριότητας χρησιμοποιείται η έννοια του MET-min, η οποία είναι το γινόμενο των MET της φυσικής δραστηριότητας, επί τη διάρκεια της φυσικής δραστηριότητας (σε λεπτά). Το 1 MET-min μιας φυσικής δραστηριότητας αποτελεί την ενέργεια που δαπανά ένας άνθρωπος 60 κιλών για τη συγκεκριμένη φυσική δραστηριότητα και αποτελεί ένα μέγεθος που μεταβάλλεται συναρτήσει του χρόνου και της έντασης της δραστηριότητας. Το ερωτηματολόγιο IPAQ επιτρέπει την κατηγοριοποίηση των ερωτώμενων σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με τα επίπεδα φυσικής δραστηριότητας.

-μη ενεργά άτομα- καθιστική ζωή: τα άτομα τα οποία δεν πληρούν τα κριτήρια για να κατηγοριοποιηθούν σε μια από τις ακόλουθες κατηγορίες χαρακτηρίζονται ως μη ενεργά ή ως ανεπαρκώς ενεργά.

- κατ' ελάχιστο ενεργά άτομα: τα άτομα που (i) εκτελούν έντονη φυσική δραστηριότητα τουλάχιστον 3 φορές/εβδομάδα, διάρκειας τουλάχιστον 20 λεπτών/ημέρα, ή (ii) εκτελούν μέτριας έντασης φυσική δραστηριότητα ή περπάτημα για 5 ή περισσότερες ημέρες ανά εβδομάδα, διάρκειας τουλάχιστον 30 λεπτών/ημέρα ή (iii) εκτελούν οποιονδήποτε συννδυασμό δραστηριοτήτων απιτυγχάνοντας τουλάχιστον 600 MET-min/εβδομάδα.

-ενεργό άτομο με επίπεδα φυσικής δραστηριότητας ικανά για την προαγωγή της υγείας (Health Enhancing Physical Activity Active, HEPA active): στην κατηγορία αυτή εντάσσονται τα άτομα που (i) εκτελούν έντονη φυσική δραστηριότητα για τουλάχιστον 3 ημέρες/εβδομάδα, επιτυγχάνοντας συνολικά τουλάχιστον 1500 MET-min/εβδομάδα ή (ii) εκτελούν 7 ή περισσότερες ημέρες οποιουδήποτε συνδυασμού φυσικών δραστηριοτήτων, φτάνοντας συνολικά 3000 MET-min/εβδομάδα.

5.3.3 Αξιολόγηση διατροφικών συνηθειών

Η εκτίμηση των διατροφικών συνηθειών των εθελοντών έγινε πριν από κάθε πρωτόκολλο άσκησης τόσο με 3 ανακλήσεις 24 ώρου όσο και με ερωτηματολόγιο συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων (Food Frequency Questionnaire-FFQ).

Το ερωτηματολόγιο συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων που χρησιμοποιήθηκε επιτρέπει την αξιολόγηση συμμόρφωσης με τη μεσογειακή διατροφή σύμφωνα με τους Panagiotakos et al. (Panagiotakos, Pitsavos, Arvaniti, & Stefanadis, 2007). Το σκορ συμμόρφωσης με τη μεσογειακή διατροφή παρουσιάζεται στον Πίνακα 5.1.

Πίνακας 5. 1: Σκορ συμμόρφωσης με τη μεσογειακή διατροφή *(Panagiotakos, Pitsavos, Arvaniti, & Stefanadis, 2007)*

Ομάδες τροφίμων	Συχνότητα κατανάλωσης (μερίδες/ εβδ)					
Μη επεξεργασμένα δημητριακά	Ποτέ	1-6	7-12	13-18	19-31	>32
	0	1	2	3	4	5
Πατάτες	Ποτέ	1-4	5-8	9-12	13-18	>19
	0	1	2	3	4	5
Φρούτα	Ποτέ	1-4	5-8	9-15	16-21	>22
	0	1	2	3	4	5
Λαχανικά	Ποτέ	1-6	7-12	13-20	21-32	>33
	0	1	2	3	4	5
Όσπρια	Ποτέ	<1	1-2	3-4	5-6	>6
	0	1	2	3	4	5
Ψάρια	Ποτέ	<1	1-2	3-4	5-6	>6
	0	1	2	3	4	5
Κόκκινο κρέας και προϊόντα του	≤1	2-3	4-5	6-7	8-10	>10
	5	4	3	2	1	0
Πουλερικά	≤ 3	4-5	5-6	7-8	9-10	>10
	5	4	3	2	1	0
Πλήρη γαλακτοκομικά (τυρί, γιαούρτι, γάλα)	≤ 10	11-15	16-20	21-28	29-30	>30
	5	4	3	2	1	0
Χρησιμοποίηση ελαιολάδου στο μαγείρεμα	Ποτέ	Σπάνια	<1	1-3	3-5	Καθημερινά
	0	1	2	3	4	5
Αλκοόλ (mL/ημέρα) 100 ml= 12 g αιθανόλης	<300	300	400	500	600	>700
	5	4	3	2	1	0

5.3.4 Υπολογισμός Μέγιστης Πρόσληψης Οξυγόνου

Η μέγιστη πρόσληψη οξυγόνου των εθελοντών αξιολογήθηκε με την κυλοεργομετρική δοκιμασία Astrand-Rythming. Πρόκειται για μια μονοφασική υπομέγιστη δοκιμασία, συνολικής διάρκειας 6 λεπτών, σε μηχανικό κυκλοεργόμετρο και με τη βοήθεια καρδιοσυχνόμετρου και χρονόμετρου.

Τοποθέτηση δοκιμαζόμενου: Το κάθισμα του κυκλοεργόμετρου βρισκόταν σε τέτοιο ύψος ώστε όταν ο δοκιμαζόμενος κάθεται σε αυτό και όταν το πεντάλ βρίσκεται στη χαμηλότερη θέση, να υπάρχει μια ελαφρά κάμψη στο γόνατο. Το πεντάλ ήταν σε επαφή, καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμασίας, με το μπροστινό μέρος του πέλματος. Η

θέση του τιμονιού ήταν τέτοια ώστε να επιτρέπει στον κορμό να βρίσκεται σε ελαφρά κλίση προς τα εμπρός με τεντωμένα τα χέρια.

Πριν αρχίσει η δοκιμασία, ο δοκιμαζόμενος πραγματοποιούσε ένα στάδιο προθέρμανσης 2-3 λεπτών χωρίς φορτίο (Watt) με συχνότητα περίπου 50 rpm (περιστροφές το λεπτό). Κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας γινόταν συνεχής έλεγχος της καρδιακής συχνότητας, η οποία καταγραφόταν στο τέλος του 3^{ου} και του 6^{ου} λεπτού. Η επιβάρυνση ήταν τέτοια ώστε στο τέλος του 3^{ου} λεπτού, ο εθελοντής να έχει αποκτήσει περίπου 130 παλμούς/λεπτό και στο τέλος του 6^{ου}, περίπου 150 παλμούς/λεπτό. Επιπλέον, ο ρυθμός ποδηλάτησης ελεγχόταν με χρήση του κοντέρ και έπρεπε να διατηρείται σταθερός, στα 70 rpm. Με την αποπεράτωση της δοκιμασίας, ο δοκιμαζόμενος συνέχιζε να ποδηλατεί έως ότου η καρδιακή του συχνότητα γινόταν μικρότερη των 100 b/min.

Η τιμή VO_2max εξάχθηκε βάσει των παρακάτω εξισώσεων:

Για άνδρες: **VO_{2max}(l/min)= VO_2 x [(220-ηλικία)-61] / (ΚΣ-61),**

Για γυναίκες: **VO_{2max}(l/min)= VO_2 x [(220-ηλικία)-72] / (ΚΣ-72),**

όπου VO_2(l/min)=Watts (6^{ου} λεπτού) x 0,012 + 0,3

ΚΣ: η καρδιακή συχνότητα στο τέλος του 6^{ου} λεπτού

Έπειτα, για να μπορέσουν να πραγματοποιηθούν συγκρίσεις μεταξύ των ατόμων, λήφθηκε υπόψη το σωματικό τους βάρος (ΣΒ):

VO_{2max} (ml/ min ∗kg)= [VO_{2max}(l/min) ∗1000] / ΣΒ

5.3.5 Αξιολόγηση δύναμης των κάτω άκρων (Counter Movement Jump- CMJ, Squat Jump-SQJ)

Η αξιολόγηση της δύναμης των κάτω άκρων πραγματοποιήθηκε με το Optojump. Το Optojump είναι ένα οπτικό σύστημα μέτρησης που αποτελείται από δύο μπάρες που τοποθετούνται παράλληλα στο έδαφος και επικοινωνούν μεταξύ τους μέσω των led φωτοκύτταρων που διαθέτει η καθεμία. Αυτό καθιστά δυνατή τη μέτρηση του χρόνου πτήσης και επαφής κατά την εκτέλεση μιας σειράς από άλματα με μεγάλη ακρίβεια. Με βάση αυτά τα στοιχεία, το ειδικό λογισμικό καθιστά δυνατό τον υπολογισμό μιας σειράς παραμέτρων που συνδέονται με την απόδοση του αθλητή και του ασκούμενου με τη μέγιστη ακρίβεια και σε πραγματικό χρόνο.

CMJ: Ο εθελοντής στεκόταν σε όρθια στάση ανάμεσα από τις δύο μπάρες για κάποια δευτερόλεπτα και με τα χέρια σε μεσολαβή. Στη συνέχεια λύγιζε τα γόνατα του σε γωνία περίπου 90°και εκτελούσε ένα μέγιστο άλμα, κρατώντας τα πόδια του τεντωμένα και κάθετα στο έδαφος.

SQJ: Ο εθελοντής στεκόταν ανάμεσα από τις δύο μπάρες με τα χέρια σε μεσολαβή και τα πόδια λυγισμένα περίπου στις 90° (αρχική στάση τεστ) και εκτελούσε ένα μέγιστο άλμα, κρατώντας τα πόδια του τεντωμένα και κάθετα στο έδαφος.

Και στις δύο περιπτώσεις έγιναν 3 επαναλήψεις από τις οποίες βγήκε ένας μέσος όρος.

5.3.6 Γωνία μέγιστης κάμψης της άρθρωσης του αγκώνα, και του γονάτου

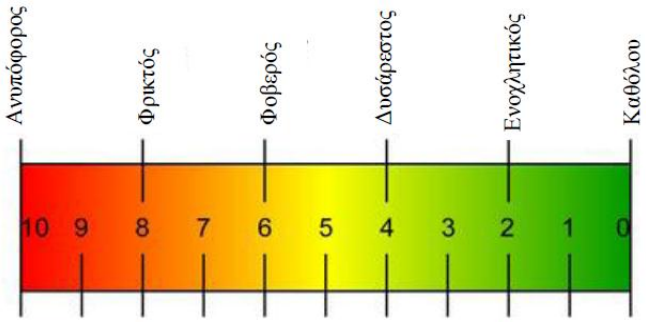
Όσον αφορά στο πρωτόκολλο άσκησης στο χέρι, μετρήθηκε η γωνία μέγιστης κάμψης του αγκώνα, εφαρμόζοντας μια μέθοδο γωνιομέτρησης με κατάλληλο γωνιόμετρο, προκειμένου να εξεταστεί πόσο μεγαλώνει η γωνία μετά την πρόκληση ΑΜΒ. Αφού σημαδεύονταν συγκεκριμένα ανατομικά σημεία -κεφαλή βραχιόνιου οστού (ώμος), ωλέκρανου (αγκώνας), καρπός- με κατάλληλη τοποθέτηση του γωνιόμετρου βρισκόταν η γωνία όπου ο δοκιμαζόμενος προσπαθούσε να κάμψει όσο το δυνατόν περισσότερο τον αγκώνα με στόχο να ακουμπήσει τον ώμο με την παλάμη του.

Στο πρωτόκολλο του ποδιού η μετρούμενη γωνία ήταν η γωνία μέγιστης κάμψης του γονάτου, δηλαδή η γωνία μεταξύ του ισχιακού οστού, γονάτου και αστραγάλου. Ο δοκιμαζόμενος βρισκόταν σε ξαπλωμένη πλάγια θέση, με τεντωμένα πόδια αρχικά. Με τη βοήθεια του ίδιου χάρακα μετρούνταν η γωνία που σχηματιζόταν καθώς ο δοκιμαζόμενος προσπαθούσε να ακουμπήσει το γλουτό του με τη φτέρνα, χωρίς να αλλάξει η αρχική θέση του μηρού.

5.3.7 Αντίληψη της έντασης του καθυστερημένου μυϊκού πόνου

Για την αξιολόγηση του καθυστερημένου μυϊκού πόνου χρησιμοποιήθηκε μία οπτική αναλογική κλίμακα (Visual Analog Scale – VAS) (υποκειμενικής αξιολόγησης του πόνου) ενός σημείου για το χέρι και πέντε σημείων για το πόδι, η οποία συνίσταται από μία ευθεία γραμμή μήκους 10 εκατοστών όπου, η μία της άκρη αντιστοιχεί στην ένδειξη «καθόλου πόνος» και η άλλη της στην ένδειξη «ανυπόφορος πόνος» (Εικόνα 5.1). Οι

δοκιμαζόμενοι καλούνταν να αξιολογήσουν το επίπεδο του πόνου σημειώνοντας το σημείο της κλίμακας που καλύτερα αντανακλούσε τον πόνο που αισθάνονταν στους σε συγκεκριμένους μυς -τετρακεφάλου, δικεφάλου, προσαγωγού, απαγωγού καθώς και γαστροκνημίου για το πόδι, και δικεφάλου για το χέρι), μετά από κατάλληλη διάταση του εκάστοτε μυός. Η κλίμακα αυτή έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε ανάλογες έρευνες και έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί έγκυρη και αξιόπιστη κλίμακα (αριθμητική) για την αξιολόγηση του πόνου σε κλινικές ή πειραματικές συνθήκες (Thompson, 1999).



Εικόνα 5.1 : Οπτική αναλογική κλίμακα Πόνου (VAS)

5.3.8 Περίμετρος

Η περίμετρος του βραχιονίου στο μέσον του προσδιορίστηκε με την χρήση μεζούρας ακριβείας στο μέσον της ευθείας που ορίζουν το πλάγιο όριο του ακρωμίου και η παρακονδύλια απόφυση του βραχιονίου. Το σημείο μέτρησης της περιμέτρου επίσης «σημαδευόταν» με την χρήση του μαρκαδόρου, προκειμένου να γίνεται στο ίδιο ύψος η μέτρηση της περιμέτρου στα διάφορα χρονικά σημεία εξέτασης.

Η περίμετρος του μηρού στο μέσον του προσδιορίστηκε με τον ίδιο τρόπο στο μέσον της ευθείας που ορίζουν η επιγονατίδα και το ισχιακό οστό.

5.4 Συλλογή βιολογικών δειγμάτων

5.4.1 Σύλλογη αίματος

Όλες οι αιμοληψίες έγιναν σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο του Εργαστηρίου Διατροφής και Κλινικής Διατροφολογίας από έμπειρο προσωπικό. Σε κάθε αιμοληψία

λαμβάνονταν 26 ml αίματος. Από αυτά τα 10 ml χρησιμοποιούνταν για την απομόνωση του ορού (vacutainers ορού), 6 ml για τη γενική αίματος (vacutainers με αντιπηκτικό EDTA), την απομόνωση πλάσματος και ερυθροκυττάρων, 6 ml για την απομόνωση λευκοκυττάρων (vacutainer με Lithium Heparin) και 4 ml για την απομόνωση αιμοπεταλίων (vacutainer με κιτρικό νάτριο).

5.5 Γενική αίματος

Η γενική αίματος γινόταν σε αυτόματο αιματολογικό αναλυτή BC-3000 (Mindray) σε ολικό αίμα που είχε παραληφθεί σε vacutainer με αντιπηκτικό EDTA μετά από ήπια ανάδευση.

5.6 Πρωτόκολλα απομόνωσης κυττάρων

5.6.1 Απομόνωση πλάσματος

Όργανα

-Φυγόκεντρος (Avanti 30 centrifuge, Beckman)

Διαδικασία

Το ολικό αίμα (6ml) που έμεινε από τη γενική αίματος στο vacutainer με EDTA φυγοκεντρείται στα 1500 g, επί 10 λεπτά, στους 15°C. Το υπερκείμενο πλάσμα παραλαμβάνεται, μοιράζεται σε σωλήνες τύπου eppendorfs και φυλλάσεται στους -80°C.

5.6.2 Απομόνωση ορού

Όργανα

-Φυγόκεντρος (Avanti 30 centrifuge, Beckman)

Διαδικασία

Για την απομόνωση του ορού δέκα (10) mL αίματος λαμβάνονται σε σωλήνες αιμοληψίας κενού των 10 mL και αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου 15-20 λεπτά μέχρι την πλήρη πήξη. Στη συνέχεια φυγοκεντρούνται στα 1500 g για 20 λεπτά σε θερμοκρασία 15°C και παραλαμβάνεται το υπερκείμενο, που αποτελεί τον ορό. Το υπερκείμενο μοιράζεται σε σωλήνες τύπου eppendorfs και φυλλάσεται στους -80°C.

5.6.3 Απομόνωση λευκοκυττάρων

Όργανα

-Φυγόκεντρος (Avanti 30 centrifuge, Beckman)

-Ομογενοποιητής υπερήχων (Bandelin Sonoplus sonicator GM 2070, Germany)

Διαλύματα

-Δεξτράνη 3% σε φυσιολογικό ορό (NaCl 0,15 M)

-Διάλυμα λύσης ερυθροκυττάρων (lysis buffer): 155 mM NH_4Cl, 10 mM $KHCO_3$,0,1 mM EDTA

-Διάλυμα αναδιάλυσης Tris-HCl (50 mM-pH 7,4)

-Φυσιολογικός ορός (NaCl 0,15 M)

-HCl 1N

Διαδικασία

Το περιεχομένο του vacutainer ηπαρίνης μεταφέρεται σε πλαστικό σωλήνα που περιέχει 1,2 ml διαλύματος δεξτράνης 3% και αναδεύεται. Μετά από παραμονή 20 λεπτών, κατά την οποία σχηματίζονται δύο φάσεις στο σωλήνα, λαμβάνεται το, πλούσιο σε λευκοκύτταρα, υπερκείμενο, σε καινούργιο σωλήνα. Φυγοκεντρείται στα 500 g για 10 λεπτά, στους 15°C. Μετά από απόχυση του υπερκειμένου, προστίθενται 5 ml διαλύματος λύσης και γίνεται ήπια ανάδευση με πιπέτα. Ακολουθεί παραμονή 5 λεπτών και το περιεχόμενο του σωλήνα φυγοκεντρείται στα 300 g επί 10 λεπτά, στους 15°C. Γίνεται ξανά απόχυση του υπερκειμένου και αφού προστεθεί 1 ml Tris-HCl, γίνεται κατεργασία με υπέρηχους (Sonication) 3x10 δευτερόλεπτα, στα 40 Watt (τοποθέτηση σε πάγο). Τέλος, το ομογενοποίημα φυγοκεντρείται στα 500g, για 10 λεπτά στους 4°C, και το υπερκείμενο διαμοιράζεται σε eppendorfs και φυλλάσεται στους -80°C .

5.7 Προσδιορισμός της δραστικότητας αντιοξειδωτικών ενζύμων

5.7.1 Προσδιορισμός δραστικότητας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης στον ορό (GPX3)

5.7.1.1 Αρχή της μεθόδου

Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (glutathione peroxidase, GPX) καταλύει την αναγωγή των υδροϋπεροξειδίων, συμπεριλαμβανομένων και των υπεροξειδίων του υδρογόνου, με τη βοήθεια της ανηγμένης γλουταθειόνης, λειτουργώντας έτσι ως προστατευτικός μηχανισμός ενάντια στην οξειδωτική καταστροφή των κυττάρων. Το ένζυμο χρησιμοποιεί την γλουταθειόνη ως το μοναδικό δότη ηλεκτρονίων προκειμένου να αναγεννηθεί η ανηγμένη μορφή της σεληνοκυστεΐνης.

Στο συγκεκριμένο πείραμα η δραστικότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPX) μετρήθηκε έμμεσα μέσω μιας συζευγμένης αντίδρασης με την αναγωγάση της γλουταθειόνης (Glutathione Reductase, GR). Η οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG), που παράγεται ύστερα από την αναγωγή των υδρουπεροξειδίων από την GPX, μετατρέπεται ξανά στην ανηγμένη της μορφή από την αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR) και το NADPH (ανηγμένη μορφή του β- νικοτιναμιδο αδενινο φωσφορικού δινουκλεοτιδίου), σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:

$$2\ GSH + H_2O_2 \xrightarrow{\text{Glutathione Peroxidase}} GSSG + 2\ H_2O$$

$$GSSG + \text{ß-NADPH} \xrightarrow{\text{Glutathione Reductase}} \text{ß-NADP} + 2\ GSH$$

Η οξείδωση του NADPH σε $NADP^+$ συνοδεύεται από μία μείωση στην απορρόφηση στα 340nm. Ο ρυθμός της μείωσης της απορρόφησης στα 340nm είναι ανάλογος της δραστικότητας της GPX στο δείγμα.

5.7.1.2 Διαλύματα

- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Sodium Phosphate Buffer, PBS) 50 mM με EDTA 0.4 mM/pH 7.0 (PBS/EDTA): Διαλύονται 3,450 g NaH_2PO_4 και 0,0832 g EDTA σε 100 mL απεσταγμένο νερό. Το pH ρυθμίζεται με την χρήση NaOH 1M.
- Διάλυμα νατραζιδίου (NaN_3) 1 mM σε PBS 50 mM/EDTA 0.4 mM/pH 7.0 (PBS/Sodium azide): Διαλύονται 0,0032 g NaN_3 σε 50 mL PBS/EDTA.
- Διάλυμα αναγωγάσης της γλουταθειόνης 100 U/mL (GR): Αραίωση stock διαλύματος αναγωγάσης (stock: 255U/ml) με παγωμένο απεσταγμένο νερό. Παρασκευάζεται αμέσως πριν το πείραμα.
- Διάλυμα ανηγμένης γλουταθειόνης 200 mM (GSH): 0,0615 g GSH σε 1 mL απεσταγμένο νερό.
- Διάλυμα H_2O_2 0,0105% (H_2O_2): 17,5 μL διαλύματος H_2O_2 30% σε 50 μL απεσταγμένο νερό.
- Διάλυμα NADPH: 1 mg NADPH σε 100 μL PBS/EDTA

5.7.1.3 Αναλυτική πορεία

Λίγο πριν το πείραμα παρασκευάζονται τα διαλύματα του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) και το μίγμα της αντίδρασης, σύμφωνα με τις παραπάνω αναλογίες:

PBS/Sodium azide	9200 μL
GR	36μL
GSH	50μL
NADPH	100μL

Έπειτα, προστίθενται τα παρακάτων στα πηγαδάκια των plates και έγινε μέτρηση της απορρόφησης στα 340nm ανά 1 λεπτό, επί 6 λεπτά.

	blank	**Sample**
Μίγμα αντίδρασης	200μL	200μL
Φυσιολογικός ορός	30 μL	
Διαλύμα GPX (δείγμα ορού)		30μL
Διάλυμα H_2O_2	20μL	20μL

5.7.1.4 Υπολογισμοί

$$\text{Units/mL παρασκευάσματος} = \frac{(\Delta A/\text{min, δείγματος} - \Delta A/\text{min, τυφλού}) \times 2 \times 0{,}250}{4{,}60 \times 0{,}03}$$

όπου:

ΔΑ: Διαφορά Απορρόφησης

2: Τα 2 μmoles της GSH που παράγονται για κάθε μmole NADPH που οξειδώνεται

0,250: Ο τελικός όγκος του περιεχομένου του κάθε πηγαδιού του πλακιδίου σε mL

4,60 : Ο συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας του NADPH στα 340 nm και για όγκο 0,255 mL (μήκος οπτικής διαδρομής: 0,9 cm)

0,03 : Ο όγκος σε mL του ενζυμικού παρασκευάσματος που χρησιμοποιείται στην πειραματική διαδικασία ανά πηγάδι του πλακιδίου

5.7.2 Προσδιορισμός δραστικότητας της υπεροξειδικής δισμουτάσης στον ορό (SOD3) με την μέθοδο οξειδάσης της ξανθίνης/ξανθίνης/κυτοχρώματος c

5.7.2.1 Αρχή μεθόδου

Οι SOD είναι μεταλλοένζυμα που καταλύουν την οξειδοαναγωγή του ανιόντος υπεροξειδίου σε μοριακό οξυγόνο και έτσι παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στον αντιοξειδωτικό αμυντικό μηχανσιμό του κυττάρου. Η οξειδάση της ξανθίνης καταλύει την αντίδραση της ξανθίνης με το οξυγόνο, δίνοντας υπεροξείδιο με ρυθμό~ 1 μM/min. Αυτό αντιδρά με το ferricytochrome c και το ανάγει σε ferrocytochrome c, προκαλώντας αύξησης της απορρόφησης στα 550 nm, με αύξηση του συντελεστή μοριακής απορρόφησης κατά 20.000 cm^{-1} (από 9000 στα 29000 cm^{-1}). Η παρουσία SOD στο μίγμα της αντίδρασης μειώνει την παραγωγή O_2^-. και συνεπώς την αναγωγή του κυτοχρώματος c σε βαθμό τόσο μεγαλύτερο όσο και η δραστικότητα της SOD.

5.7.2.2 Όργανα/υλικά

Φωτόμετρο (Spectrophotometer Pharmacia Biotech, Novaspec II)

Κυψελίδες 1 ml

5.7.2.3 Διαλύματα

- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου 0,05M, pH 7,8. Ζυγίζονται 3,40g KH_2PO_4 και διαλύονται σε 500ml απιονισμένο H_2O. Η ρύθμιση του pH γίνεται με δ/μα KOH 1N.
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου 0,05M, pH 7,8/EDTA 0.1mM. Ζυγίζονται 0,0093g EDTA και διαλύονται σε 250ml ρυθμιστικού δ/τος φωσφορικού καλίου 0,05M, pH 7,8. Η ρύθμιση του pH γίνεται με δ/μα KOH 1N.
- Διάλυμα KOH 4N: Ζυγίζονται 11,222 g KOH (MW=56) σε 50mL H_2O
- Stock διάλυμα κυτόχρωμα c 1mM: ζυγίζονται 250mg κυτοχρώματος c (MW~ 13000) για 19,23 mL ρυθμιστικού δ/τος φωσφορικού καλίου 0,05M, pH 7,8. Φυλάσσεται στους -20°C.
- Διάλυμα ξανθίνης 1mM: ζυγίζονται 0,0174g και διαλύονται σε 100mL ρυθμιστικού δ/τος KH_2PO_4 0,05M, pH 7,8. Φυλάσσεται στους -20°C.
- Stock δ/μα οξειδάσης της ξανθίνης 3 units/ml: Η αρχική συγκέντρωση του προϊόντος είναι 32 units/ml. Αναδιάλυση σε όγκο 2,1 ml με ρυθμιστικό δ/μα PBS/EDTA. Φυλάσσεται στους -20°C.
- Working δ/μα οξειδάσης της ξανθίνης 0,3 units/ml: αραίωσης 1:10 του stock δ/τος.
- Στερεό sodium dithionate
- SOD assay cocktail: Σε 141 ml ρυθμιστικού δ/τος φωσφορικού καλίου 0,05M, pH 7,8/EDTA 0,1 mM προστίθενται 7,5ml stock δ/τος ξανθίνης. Προστίθενται 1,5ml δ/μα κυτοχρώματος c. Ελέγχεται η συγκέντρωση του κυτοχρώματος c με προσθήκη μιας μικρής ποσότητας σε κυψελίδα οπτικής διαδρομής 1 cm και μετρώντας την απορρόφηση στα 550nm. Προστίθενται μερικοί κρύσταλλοι στερεού sodium dithionate, αναδεύεται και μετράται ξανά η απορρόφηση, η οποία πρέπει να αυξηθεί ακριβώς κατά 0,2.

5.7.2.4 Αναλυτική πορεία

Το φωτόμετρο ρυθμιζόταν στα 550nm. Εισαγάγαμε σε κυψελίδα, με τη σειρά, 1 ml SOD assay cocktail, 90μL φυσιολογικός ορός, και 10 μL διαλύματος οξειδάσης της ξανθίνης. Μόλις το τελικό διάλυμα αναδευόταν, τοποθετούνταν στο φωτόμετρο και καταγραφόταν η απορρόφηση ανά λεπτό, με χρήση ψηφιακού χρονόμετρου, επί 5 λεπτά. Η απορρόφηση έπρεπε να αυξάνεται περίπου κατά 0,02 A/min (μεταξύ 0,015 και 0,025 A/min). Στην περίπτωση που η ταχύτητα control ήταν μεγαλύτερη, ο όγκος της οξειδάσης της ξανθίνης ρυθμιζόταν έτσι ώστε να επιτευχθεί η συγκεκριμένη ταχύτητα. Στη συνέχεια, σε 1 ml SOD assay cocktail, τοποθετούνταν 90μL δείγματος και 10μL διαλύματος οξειδάσης της ξανθίνης (ή μικρότερος όγκος, ανάλογα με τον όγκο της στο control) και καταγραφόταν ξανά η απορρόφηση, επί 5 λεπτά.

Βάσει θεωρητικής εξίσωσης, μια αύξηση απορρόφησης του control περίπου 0,02 A/min -), αντιστοιχεί σε μια αναστολή 40-60% του δείγματος. Η % αναστολή τόσο στο control όσο και στα δείγματα υπολογίστηκε ως εξής:

% inhibition = [(control – sample) / control] x 100

Κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη αναφοράς της ενεργότητας της SOD, βάσει των παρακάτω τιμών (Πίνακας 5.2), προκειμένου να υπολογιστεί η δραστικότητα της SOD (u/ml) που περιεχόταν στα δείγματα.

Πίνακας 5. 2*:* Τιμές ενεργότητας SOD

U/ml	0,027	0,090	0,270	0,360	0,450	0,630	0,810
%Inh	7,30	13,00	36,00	48,00	54,70	60,00	75,50

5.7.3 Προσδιορισμός δραστικότητας της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) στα λευκοκύτταρα με την μέθοδο οξειδάσης της ξανθίνης/ξανθίνης/ κυτοχρώματος c

Η διαδικασία προσδιορισμού της δραστικότητας της SOD λευκοκυττάρων ήταν ακριβώς ίδια, με τη διαφορά ότι προκειμένου να επιτευχθεί αναστολή 40-60%, τοποθετούνταν 50 μL δείγματος και συμπληρώναμε με (40μL) διαλύματος HCL-Tris (50 mM-pH 7,4).

Προκειμένου να υπολογστούν τα U/ml της SOD, χρησιμοιήθηκε η ίδια καμπύλη αναφοράς. Τέλος, έγινε κανονικοποίηση με τη μετρούμενη ποσότητα πρωτεΐνης (mg) (βλ. Μέθοδο Bradford), και τελικά η δραστικότητα της SOD εκφράστηκε σε U/mg.

5.7.4 Προσδιορισμός πρωτεΐνης με την μέθοδο Bradford

5.7.4.1 Αρχή μεθόδου

Η χρωστική που περιέχεται στο αντιδραστήριο Bradford συμπλέκεται με τις πρωτεΐνες προκαλώντας μια μετατόπιση της μέγιστης απορρόφησης της χρωστικής από 465 σε 595 nm. Η απορρόφηση είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης. Η γραμμικότητα της ανάλυσης κυμαίνεται από 0,2-3 μg/μL πρωτεΐνης, ως προς BSA.

5.7.4.2 Όργανα/Υλικά

- Φασματοφωτόμετρο μικροπλακιδίων (TECAN)
- Μικροπλακίδια 96 βοθρίων

5.7.4.3 Διαλύματα

- Διάλυμα βόειου αλβουμίνης ορού (BSA) σε νερό με συγκέντρωση 0,25 μg/μL
- Διάλυμα φύλαξης Bradford: Διάλυμα Coomassie Brilliant Blue G 0,5 mg/mL και φωσφορικού οξέος 42,5% σε μεθανόλη 25%
- Διάλυμα εργασίας Bradford: Αραίωση διαλύματος φύλαξης Bradford 1/5 με απεσταγμένο νερό (1 όγκος διαλύματος φύλαξης και 4 όγκοι απεσταγμένου νερού).

5.7.4.4 Αναλυτική πορεία

Τα δείγματα αραιώθηκαν (1/10) και προστέθηκαν 5 μL στα βοθρία, σε 195μL απεσταγμένου νερού. Παράλληλα, για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς προστέθηκαν κατάλληλες ποσότητες από το αρχικό διάλυμα της BSA (0,25 μg/μL) έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση της BSA στο διάλυμα φωτομέτρησης να είναι 0,2, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0 μg/μL BSA στα βοθρία. Ο τελικός όγκος σε κάθε βοθρίο ήταν 200 μL (συμπλήρωση με απεσταγμένο νερό). Η αντίδραση ξεκινούσε με την προσθήκη 50 μL αντιδραστηρίου εργασίας Bradford. Μετά από ανάδευση και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, τα δείγματα και τα πρότυπα φωτομετρούνταν στα 595nm. Τόσο τα πρότυπα διαλύματα, όσο και τα άγνωστα αναλύθηκαν εις διπλούν και υπολογίστηκε ο μέσος όρος των απορροφήσεων.

Από την καμπύλη αναφοράς των προτύπων διαλυμάτων υπολογίστηκε η συγκέντρωση των αγνώστων δειγμάτων.

5.8 Στατιστική ανάλυση

Η κανονικότητα των συνεχών μεταβλητών εξετάσθηκε με εφαρμογή του ελέγχου Kolmogorov-Smirnov. Αν και οι περισσότερες μεταβλητές εμφανίζουν κανονική κατανομή, εξαιτίας του μικρού μεγέθους (n=5) του δείγματος εφαρμόστηκαν μη παραμετρικές μέθοδοι ανάλυσης. Οι μεταβλητές παρουσιάζονται ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση στα διαγράμματα και ως διάμεσος (25° -75° εκατοστημόριο). Οι συσχετίσεις μεταξύ των συνεχών μεταβλητών έγιναν με τη χρήση του συντελεστή συσχέτισης Spearman. Η αναζήτηση σημαντικών μεταβολών στη δραστικότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων, στο χρόνο, για κάθε πρωτόκολλο άσκησης, έγινε με τη Friedman Rank ανάλυση. Η σύγκριση των συγκεντρώσεων (U/ml) των μεταβλητών μεταξύ του χρόνου 0 (Baseline) και των άλλων χρόνων (pre, post,2h,24h,48h) έγινε με την ανάλυση Wilcoxon. Σύγκριση των ποσοστιαίων μεταβολών των μεταβλητών στον ίδιο χρόνο αλλά για τα δύο πρωτόκολλα άσκησης, έγινε με την ανάλυση Kruskal-Wallis. Το iAUC υπολογίσθηκε από το εμβαδόν που περικλείεται μεταξύ της καμπύλης μεταβολής μίας μετρούμενης παραμέτρου και της νοητής ευθείας παράλληλης στον άξονα x, η οποία ξεκινά από την τιμή της παραμέτρου σε χρόνο 0. Οι συσχετίσεις των iAUC, μεταξύ των 2 διαφορετικών πρωτοκόλλων, έγινε με την ανάλυση Kruskal-Wallis. Όλες οι αναφερόμενες τιμές πιθανοτήτων (p) βασίζονται σε αμφίπλευρους ελέγχους και συγκρίνονται στο επίπεδο σημαντικότητας του 5%. Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν μέσω του λογισμικού στατιστικής SPSS 18 (SPSS, Inc., Chicago, IL).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.1 Ανθρωπομετρικά/σωματομετρικά χαρακτηριστικά εθελοντών

Το δείγμα της παρούσας έρευνας αποτέλεσαν 5 υγιή ενήλικα άτομα, εκ των οποίων 3 γυναίκες και 2 άντρες. Όλοι οι δοκιμαζόμενοι ήταν φυσιολογικού βάρους, με το δείκτη μάζας σώματος και τη σύσταση να μην διαφέρει μεταξύ των δύο πρωτοκόλλων($p>0,05$). Στον πίνακα 6.1 παρουσιάζονται η διάμεσος (median), με το ενδοτεταρτημοριακό εύρος 25°-75°) των βασικών ανθωπομετρικών/σωματομετρικών χαρακτηριστικών των εθελοντών, πριν την έναρξη των δύο πρωτοκόλλων.

Πίνακας 6. 1*:* Ανθρωπομετρικά/σωματομετρικά χαρακτηριστικά εθελοντών

Χαρακτηριστικό	**Διάμεσος (25°-75^oτεταρτ.)**		
Ηλικία (έτη)	23 (23,25)		
Ύψος (cm)	172 (164-174)		
VO_2max	31 (22,5-33)		
	1° πρωτόκολλο	**2° πρωτόκολλο**	**p**
ΔΜΣ (kg/m^2)	22,8 (22,1-23,4)	23,7 (22,2-24,2)	0,104
% λίπος	29,7 (16,4-31,9)	29,3 (16,4-31,2)	0,893
Διαστολική πίεση (mmHg)	65 (64-72)	70 (64-77)	0,141
Συστολική πίεση (mmHg)	105 (102-119)	110 (104-125)	0,039
Καρδιακοί παλμοί (bpm)	78 (67-89)	83 (71-91)	0,345

6.2 Διατροφικά χαρακτηριστικά

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη διατροφική ανάλυση των 5 εθελοντών παρουσιάζονται στον πίνακα 6.2. Βάσει των ερωτηματολογίων συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων που συμπλήρωσαν στην αρχή κάθε πρωτοκόλλου, εξάχθηκε το MedDietScore (Panagiotakos et al., 2007). Το MedDiet Score δεν διεφερε μεταξύ των δύο πρωτοκόλλων υποδεικνύοντας ότι οι εθελοντές μας δεν διαφοροποίησαν τις διατροφικές τους συνήθειες.

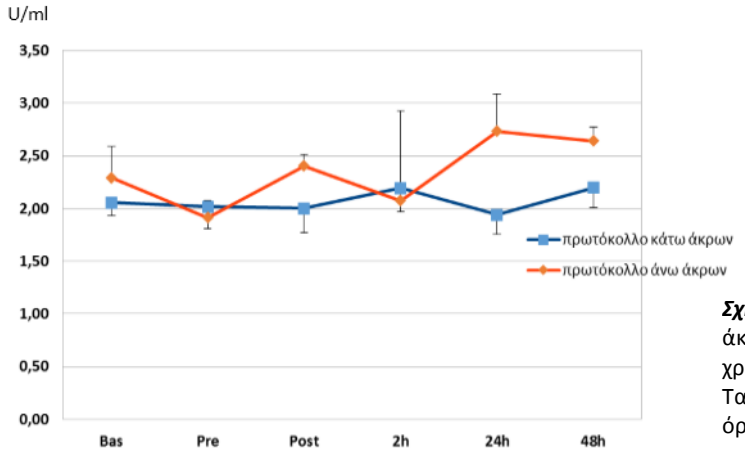
Πίνακας 6. 2: MedDietScore δοκιμαζόμενων στα δύο πρωτόκολλα και ο μέσος όρος τους

1° πρωτόκολλο	**2° πρωτόκολλο**	**Μέσος όρος**
30 (24-33,5)	30 (19-34,5)	31 (21,5-33,2)

6.3 Επίδραση άσκησης στη δραστικότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων

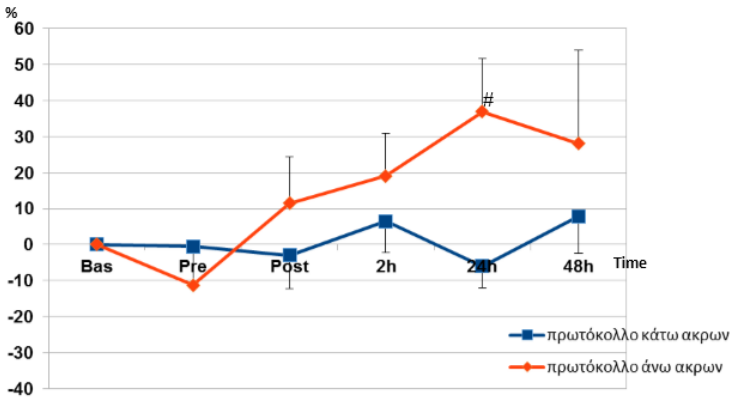
6.3.1 Επίδραση άσκησης στη δραστικότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης ορού (SOD3)

Βάσει των τιμών που προέκυψαν από τις μετρήσεις της δραστικότητας της SOD3, κατασκευάστηκε το διάγραμμα του σχήματος 6.3.1, το οποίο απεικονίζει την δραστικότητα της SOD3 (U/ml) στο χρόνο, στις διάφορες χρονικές στιγμές πριν και μετά την άσκηση, και για τα δύο πρωτόκολλα ΑΜΒ. Όσον αφορά στο πρωτόκολλο άνω άκρων, παρατηρείται μια τάση για αύξηση της SOD3, στις 24 κα 48 ώρες μετά την άσκηση, χωρίς να υπάρχει επίδραση του χρόνου στα επίπεδα δραστικότητα του ενζύμου (P=0,640).



Σχήμα 6.3. 1 Επίδραση πρωτοκόλλου άνω και κάτω άκρων στη δραστικότητα της SOD3 (U/mL), στις χρονικές στιγμές Baseline, Pre, Post, 2h, 24h, 48h. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος±τυπικό σφάλμα

Στη συνέχεια κατασκευάστηκε διάγραμμα (σχήμα 6.3.1.1) με τις τιμές της % ποσοστιαίας μεταβολής της δραστικότητας της SOD3 σε σχέση με το χρόνο 0. Στο διάγραμμα αυτό, παρατηρείται πιο ξεκάθαρα η τάση για αύξηση της δραστικότητας της SOD3, ιδιαίτερα στις 24 ώρες (P=0,08), μόνο μετά το πρωτόκολλο άνω άκρων.

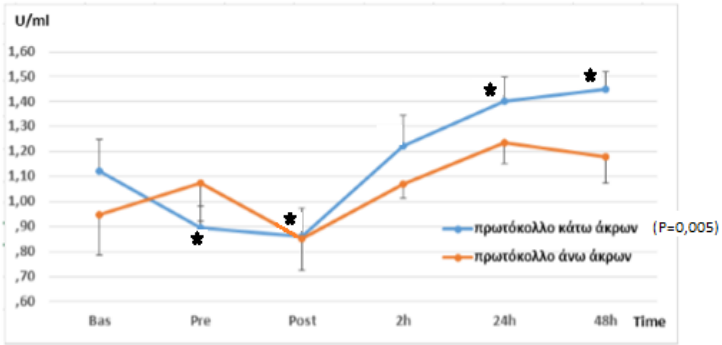


Σχήμα 6.3.1. 1 Επίδραση πρωτοκόλλου άνω και κάτω άκρων στην % μεταβολή της δραστικότητας της SOD3, στις χρονικές στιγμές Baseline, Pre, Post, 2h, 24h, 48h. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος±τυπικό σφάλμα
(#) P<0,1

6.3.2 Επίδραση άσκησης στη δραστικότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης των λευκοκυττάρων

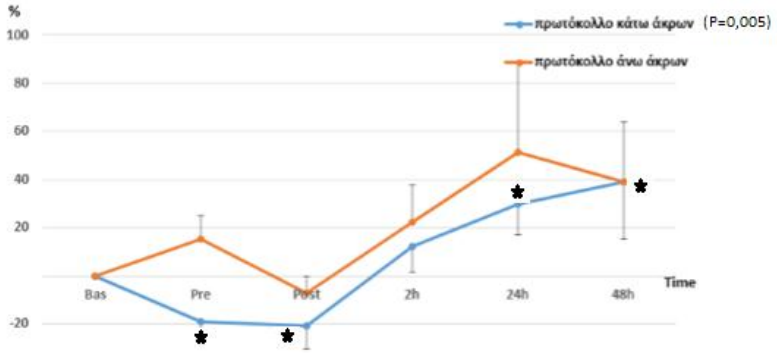
Βάσει των τιμών που προέκυψαν από τις μετρήσεις της δραστικότητας της SOD των λευκοκυττάρων, κατασκευάστηκε το διάγραμμα του σχήματος 6.3.2, το οποίο απεικονίζει την δραστικότητα της ολικής SOD (U/ml) στο χρόνο, για τα δύο πρωτόκολλα ΑΜΒ. Όσον αφορά στο πρωτόκολλο κάτω άκρων, βρέθηκε στατιστικά σημαντική η μεταβολή της SOD στο χρόνο (P=0,005), η οποία μάλιστα φαίνεται να διαφοροποιείται σημαντικά από την αντίστοιχη μεταβολή της SOD, μετά το πρωτόκολλο των άνω άκρων (P=0,043). Οι απόλυτες τιμές δραστικότητας (U/ml) των χρονικών στιγμών pre, post, 24h, 48h, εμφανίζουν σημαντική μεταβολή σε σχέση με το baseline (P=0,08)

Ωστόσο, παρατηρείται μια τάση αύξησης της δραστικότητας SOD λευκοκυττάρων και στο πρωτόκολλο άνω άκρων.



Σχήμα 6.3. 2: Επίδραση πρωτοκόλλου άνω και κάτω άκρων στη δραστικότητα της SOD στα λευκοκύτταρα (U/mL), στις χρονικές στιγμές Baseline, Pre, Post, 2h, 24h, 48h. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος±τυπικό σφάλμα

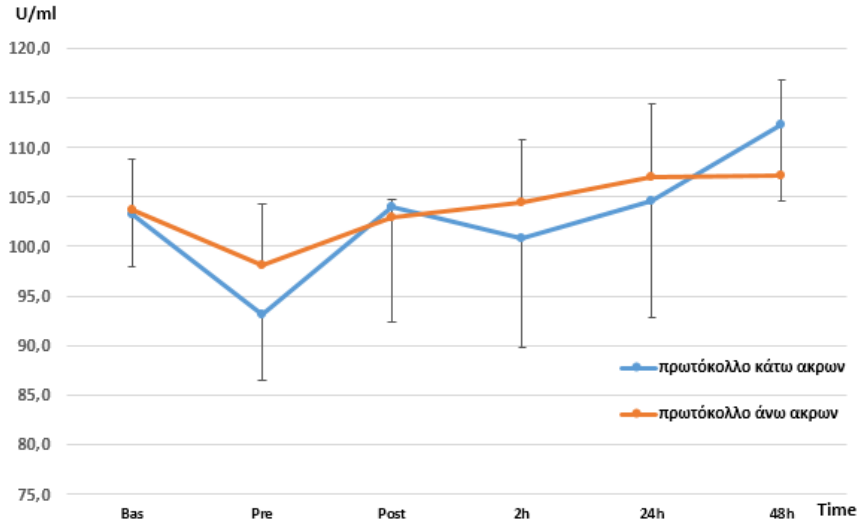
Στη συνέχεια, κατασκευάστηκε το διάγραμμα του σχήματος 6.3.2.1 με τις τιμές της % ποσοστιαίας μεταβολής της δραστικότητας της SOD λευκοκυττάρων σε σχέση με το χρόνο 0. Στο διάγραμμα αυτό, παρατηρείται ξανά η τάση αύξησης της δραστικότητας του ενζύμου, και στα δύο πρωτόκολλα, ιδιαίτερα 24 και 48 ώρες μετά την άσκηση.



Σχήμα 6.3.2 1 Επίδραση πρωτοκόλλου άνω και κάτω άκρων στην % μεταβολή της δραστικότητας της SOD στα λευκοκύτταρα, στις χρονικές στιγμές Baseline, Pre, Post, 2h, 24h, 48h. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος±τυπικό σφάλμα.

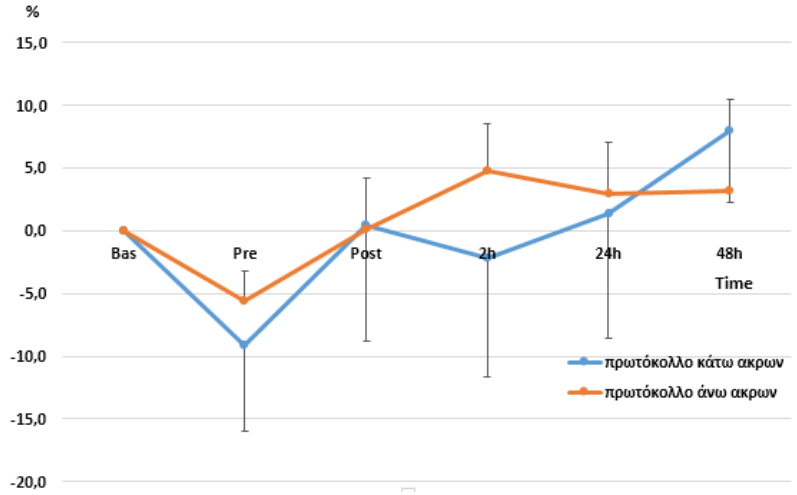
6.3.3 Επίδραση άσκησης στη δραστικότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης στον ορό (GPX3)

Βάσει των τιμών που προέκυψαν από τις μετρήσεις της δραστικότητας της GPX3, κατασκευάστηκε το διάγραμμα του σχήματος 6.3.3, το οποίο απεικονίζει τη δραστικότητα της GPX3 (U/ml) στις διάφορες χρονικές στιγμές πριν και μετά την άκση, και για τα δύο πρωτόκολλα ΑΜΒ. Δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή στο χρόνο και για τα δύο πρωτόκολλα και προφανώς καμία διαφοροποίηση στη μεταβολή της GPX3 μεταξύ των δύο πρωτοκόλλων.



Σχήμα 6.3. 3 Επίδραση πρωτοκόλλου άνω και κάτω άκρων στη δραστικότητα της GPX3 (U/mL), στις χρονικές στιγμές Baseline, Pre, Post, 2h, 24h, 48h. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος±τυπικό σφάλμα.

Στη συνέχεια, κατασκευάστηκε το διάγραμμα του σχήματος 6.3.3.1, με τις τιμές της % ποσοστιαίας μεταβολής της δραστικότητας της GPX3, για κάθε χρονική στιγμή των δύο πρωτοκόλλων, όπου δεν παρατηρήθηκε και πάλι καμία μεταβολή.



Σχήμα 6.3.3. 1 Επίδραση πρωτοκόλλου άνω και κάτω άκρων στην % μεταβολή της δραστικότητας της GPX3 στις χρονικές στιγμές Baseline, Pre, Post, 2h, 24h, 48h. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος±τυπικό σφάλμα.

6.4 Συσχετίσεις μεταξύ των μεταβολών των μετρούμενων δεικτών

6.4.1 Χαρακτηριστικά εθελοντών – Δείκτες ασκησιογενούς μυϊκής βλάβης

Αρχικά θελήσαμε να διαπιστώσουμε αν τα baseline χαρακτηριστικά των εθελοντών μας μπορούσαν να συσχετίζονται με το μέγεθος των μεταβολών των μετρούμενων αντιοξειδωτικών ενζύμων μετά τα πρωτόκολλα άσκησης. Ως μέτρο της μεταβολής λήφθηκε υπόψιν το εμβαδόν κάτω από την καμπύλη των μεταβολών. Στον πίνακα 6.4.1 φαίνονται οι σημαντικές συσχετίσεις που προέκυψαν.

Πίνακας 6.4. 1: *:* Συσχετίσεις μεταξύ (Baseline) χαρακτηριστικών των εθελοντών και μεταβολών στους δείκτες ΑΜΒ ή οξειδωτικού στρες, μετά τα δύο πρωτόκολλα άσκησης.

	Baseline Χαρακτηριστικό	**Δείκτης ΑΜΒ**	**Συσχέτιση**
Πρωτόκολλο ΑΜΒ κάτω άκρων	SOD3	AUC-DOMS γαστροκνήμιου μη επιδέξιου ποδιού	(r=0,888, p=0,044)
	SOD3	AUC-DOMS γαστροκνήμιου επιδέξιου ποδιού	(r=0,877, p=0,051)
Πρωτόκολλο ΑΜΒ άνω άκρων	BMI	AUC-GPX3	(r=0,868, p=0,056)
	SOD3	AUC-GPX3	(r=0,955, p=0,011)
	Συστολική πίεση (mmHg)	AUC-SOD-WBC	(r=-0,975, 0,005)

6.4.2 Συσχετίσεις μεταξύ των μεταβολών των δεικτών οξειδωτικού στρες-με τις μεταβολές δεικτών ασκησιογενούς μυϊκής βλάβης

Στη συνέχεια εξετάστηκε κατά πόσο η μεταβολή των δεικτών οξειδωτικού στρες σχετίζεται με τη μεταβολή των δεικτών ΑΜΒ, μετά τα δύο πρωτόκολλα ΑΜΒ. Οι συσχετίσεις παρατίθενται στον πίνακα 6.4.2

Πίνακας 6.4. 2*:* Συσχετίσεις μεταξύ των μεταβολών στους δείκτες οξειδωτικού στρες και ΑΜΒ, μετά τα δύο πρωτόκολλα άσκησης

	Δείκτης οξειδωτικού στρες	**Δείκτης ΑΜΒ**	**Συσχέτιση**
Πρωτόκολλο ΑΜΒ κάτω άκρων	AUC SOD3	AUC CMJ	r=-0,835, p=0,079)
	AUC SOD3	AUC SQJ	(r=-0,898, p=0,038)
	AUC SOD3	AUC DOMS (οπίσθιου μηριαίου μη επιδέξιου ποδιού)	(r=0,829, p=0,083)
	AUC GPX3	AUC SQJ	(r=-0,879, p=0,050)

Πρωτόκολλο ΑΜΒ άνω άκρων	Δεν βρέθηκαν συσχετίσεις

6.4.3 Σύγκριση μεταβολής της δραστικότητας SOD λευκοκυττάρων μεταξύ των δύο πρωτοκόλλων

Προκειμένου να διερευνηθεί εάν η μεταβολή της δραστικότητας της SOD των λευκοκυττάρων μεταβλήθηκε στο χρόνο περισσότερο μετά το πρωτόκολλο κάτω άκρων –όπως δείχνουν οι απόλυτες τιμές του σχήματος 6.3.2- συγκρίθηκε το εμβαδό κάτω από την καμπύλη (AUC SOD-WBC) για τα δύο πρωτόκολλα. Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά (p=0,22), συνεπώς η απόκριση του ενζύμου αυτού μετά τα δύο πρωτόκολλα δε διαφέρει.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Βασικός στόχος της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί αν και σε ποιο βαθμό η ασκησιογενής μυϊκή βλάβη, προερχόμενη από άσκηση έκκεντρης φύσεως, μπορεί να αποτελέσει μοντέλο αξιολόγησης των αντιφλεγμονωδών και αντιοξειδωτικών μηχανισμών του οργανισμού, με απώτερο σκοπό την εκτίμηση των διατροφικών αναγκών του σε μικροθρεπτικά συστατικά και βιταμίνες.

Μέχρι στιγμής, η αξιολόγηση του ενδογενούς αντιφλεγμονώδους και αντιοξειδωτικού προφίλ του ανθρώπινου οργανισμού γίνεται τις περισσότερες των περιπτώσεων με τρόπο στατικό, κάτω από συνθήκες ηρεμίας και νηστείας, χωρίς έτσι να φαίνεται η πλαστικότητα των κυτταροπροστατευτικών μηχανισμών. Αντιθέτως, μια πιο ολιστική εκτίμηση του δυναμικού του οργανισμού, θα ήταν η μελέτη της ανταπόκρισής του κάτω από στρες, με τρόπο που να είναι ελεγχόμενος και να μπορεί να εφαρμοστεί σε μεγάλους πληθυσμούς. Δεδομένου ότι η ασκησιογενής μυϊκή βλάβη μπορεί να αποτελέσει ένα στρεσογόνο μοντέλο για τον οργανισμό, αποτελεσματικά, ελεγχόμενα, έχει κλινικό φαινότυπο εύκολα μετρήσιμο (μείωση έυρους κίνησης, μυϊκός πόνος, οίδημα) και καλά χαρακτηρισμένους βιοχημικούς δείκτες μυϊκής διάρρηξης (πχ CK, LDH), φλεγμονής (πχ IL-1b, TNFa) και οξειδωτικού στρες (πχ αντιοξειδωτικά ένζυμα SOD, GPX), στοχεύσαμε στην εύρεση και εφαρμογή ενός πρωτοκόλλου, ικανό να επιφέρει AMB.

7.1 Σχολιασμός μεθοδολογίας πρωτοκόλλων

Αρχικά, τα δύο πρωτόκολλα που επιλέχθηκαν να εφαρμοστούν και να συγκριθούν, ήταν έκκεντρης φύσης. Όπως προαναφέρθηκε, είναι κοινά αποδεκτό ότι οι έκκεντρες συστολές προκαλούν μεγαλύτερη μυϊκή κάκωση 1^{ου} βαθμού σε σχέση με την ομόκεντρη συστολή, λόγω του ότι λιγότερες κινητικές μονάδες επιστρατεύονται κατά τη διάρκεια της έκκεντρης κίνησης, και έτσι μία μικρότερη εγκάρσια περιοχή του μυός πρέπει να διαχειριστεί το ίδιο φορτίο(C. M. Kerksick et al., 2013). Συνεπώς, επιλέχθηκε ένα πρωτόκολλο έκκεντρης άσκησης άνω άκρων και ένα κάτω άκρων, ώστε να διαπιστωθεί η διαφορετική επίδραση αυτών στους αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικούς δείκτες, με την υπόθεση ότι μεγαλύτερη βλάβη θα επιφέρει πιθανόν το πρωτόκολλο άνω άκρων- κάτι που επιβεβαιώνεται συχνά και από άλλες μελέτες-

λόγω της μεγαλύτερης χρησιμοποίησης των μυών του ποδιού σε δραστηριότητες έκκεντρου περιεχομένου.

Κατευθυντήρια γραμμή στην επιλογή πρωτοκόλλου ήταν η μη χρήση εξειδικευμένων οργάνων και η ευκολία στην κατανόηση και εφαρμογή της άσκησης. Για αυτό και επιλέχθηκαν δύο απλά πρωτόκολλα ΑΜΒ άνω και κάτω άκρων. Το πρωτόκολλο άνω άκρων απαιτούσε μόνο τη χρήση μιας στραβόμπαρας -καλύτερη λαβή συγκριτικά με την απλή μπάρα-, στην οποία προσαρμοζόταν επιπλέον το κατάλληλο βάρος, ενώ στο πρωτόκολλο για τα κάτω άκρα χρησιμοποιήθηκε ένα σκαλοπάτι, από το οποίο γινόταν η πτώση του δοκιμαζόμενου, άσκηση με την οποία οι μύες των ποδιών υπόκεινται σε μεγάλο μηχανικό, και μικρότερο μεταβολικό στρες.

7.2 Δοκιμαζόμενοι και κριτήρια επιλογής

Το βασικό κριτήριο επιλογής εθελοντών της έρευνας ήταν να μην εμπλέκονται σε κανένα είδος γυμναστικής, και ειδικά σε προπόνηση αντιστάσεων, δεδομένου ότι η μελέτη αποσκοπεί στην εύρεση των συνθηκών ενός πρωτοκόλλου, το οποίο μπορεί να εφαρμοστεί ευρέως, και όχι μόνο σε προπονημένα άτομα. Επιπλέον, σε άτομα απροπόνητα και με μειωμένη φυσική δραστηριότητα το ερέθισμα της έκκεντρης άσκησης είναι εντονότερο, και συνεπώς, εξίσου έντονη η αντιφλεγμονώδης και αντιοξειδωτική απόκρισή τους στην άσκηση. Για τον παραπάνω λόγο, μάλιστα, τα δύο πρωτόκολλα άσκησης απείχαν μεταξύ τους τουλάχιστον έξι εβδομάδες, ώστε να έχουν εξασθενήσει οι μυϊκές προσαρμογές από το πρώτο (φαινόμενο επαναλαμβανόμενων συνεδριών). Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι αποκλείστηκαν και τα άτομα που εμπλέκονταν σε αερόβια προπόνηση, καθώς είναι γνωστό ότι βοηθά στην αύξηση των επιπέδων των αντιοξειδωτικών ενζύμων και ιδιαίτερα των MnSOD και GPX(Mason & Wadley, 2014). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της υπομέγιστης δοκιμασίας Astrand, επιβεβαιώθηκε ότι όλοι οι δοκιμαζόμενοι είχαν χαμηλή, για την ηλικία τους, μέγιστη πρόσληψη οξυγόνου.

Άλλα σημαντικά κριτήρια ήταν να αποφύγουν να χρησιμοποιήσουν αντιφλεγμονώδη, αναλγητικά φάρμακα, συμπληρώματα διατροφής, τουλάχιστον 2 εβδομάδες πριν και κατά την διάρκεια της συμμετοχής τους στην έρευνα, και να μην προσέλθουν με οποιοδήποτε μυϊκό πόνο, ή ασθένεια, καθώς όλοι αυτοί οι παράγοντες επηρεάζουν το αντιφλεγμονώδες και αντιοξειδωτικό προφίλ, και άρα οι μετρούμενοι

βιοχημικοί δείκτες δεν θα οφείλονταν μόνο στα αποτελέσματα της ασκησιογενούς βλάβης. Επιπροσθέτως, λόγω του ότι οι ορμονικές διακυμάνσεις κατά την διάρκεια του εμμηνορροϊκού κύκλου των γυναικών έχουν δείξει κάποια επίδραση στην παραγωγή ισχύος(Bambaeichi, Reilly, Cable, & Giacomoni, 2004), αλλά και επειδή τα οιστρογόνα έχουν πιθανόν κυτταροπροστατευτική δράση, προκειμένου να είναι οι συνθήκες τυποποιημένες, οι δοκιμαζόμενες προσέρχονταν μεταξύ της 18^{ης} και 25^{ης} μέρας του κύκλου(D. A. Connolly et al., 2003).

Ήταν σημαντικό, κατά την πραγματοποίηση των δύο πρωτοκόλλων ο κάθε εθελοντής να μην έχει διαφορετικά (baseline) ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά, για αυτό και τους είχε ζητηθεί να διατηρήσουν τις διατροφικές τους συνήθειες. Την ημέρα του πρωτοκόλλου, τέλος, πέρα από το πρωινό γεύμα που δινόταν στους δοκιμαζόμενους, δεν επιτρεπόταν επιπλέον κατανάλωση φαγητού ή ποτού, έως και 2 ώρες μετά την άσκηση –δηλ. πριν την τελευταία αιμολήψια. Η επιλογή του πρωινού γεύματος βασίστηκε στην απλή προετοιμασία του, την κοινή γευστικά αποδοχή του και την κατάλληλη διατροφική σύσταση, ώστε να εξασφαλίζει την αναπλήρωση του γλυκογόνου μετά από 12ωρη νηστεία και μια σχετική αίσθηση πληρότητας καθόλη τη διάρκεια του πρωτοκόλλου.

7.3 Επιλογή δεικτών ασκησιογενούς μυϊκής βλάβης

Παρόλο που η μείωση της μέγιστης δύναμης ίσως αποτελεί τον πιο αξιόπιστο δείκτη μυϊκής βλάβης, και αυτή μπορεί να μετρηθεί με ισοκινητικό δυναμόμετρο τόσο στα άνω όσο και στα κάτω άκρα, δεν προσδιορίστηκε καθώς στα πλαίσια της λογικής της μελέτης αυτής δεν χρησιμοποιήθηκε εξεζητημένος εξοπλισμός. Οι υπόλοιποι αντιπροσωπευτικοί δείκτες που μετρήθηκαν ήταν ικανοί να δείξουν το μέγεθος της βλάβης μετά τα δύο πρωτόκολλα, ώστε να καταστεί δυνατή η σύγκρισή τους.

7.4 Επιλογή δεικτών οξειδωτικού στρες

Η αξιολόγηση του οξειδωτικού στρες των δοκιμαζόμενων επιλέχθηκε να γίνει με τη μέτρηση της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD), μιας και αποτελεί την κύρια άμυνα έναντι στις ρίζες υπερυπεροξειδίου -μετατρέποντάς το σε υπεροξείδιο του υδρογόνου-, και τη μέτρηση της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPX), εξίσου σημαντικό αντιοξειδωτικό ένζυμο- αρωγός στη μετατροπή του υπεροξειδίου σε νερό.

Η δραστικότητα αυτών των δύο αντιοξειδωτικών ενζύμων, μετρήθηκε στο αίμα που λήφθηκε από τις έξι χρονικές στιγμές του κάθε πρωτοκόλλου. Το αίμα αποτελεί τον φορέα μιας σειράς δεικτών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες. Αναλογιζόμενοι, συνεπώς, την ευκολία της δειγματοληψίας αίματος, σε πολλές συγκεκριμένες χρονικές στιγμές, τη μη επεμβατικότητα της τεχνικής, και το γεγονός ότι ο ρόλος του αίματος είναι να αφαιρεί ή να προσθέτει στους ιστούς οξειδωτικά και αντιοξειδωτικά μόρια- άρα αντικατοπτρίζει την οξειδοναγωγική κατάσταση των ιστών(Nikolaidis & Jamurtas, 2009), επιλέχθηκε αυτό, εύλογα, για την εκτίμηση του αντιοξειδωτικού προφίλ. Επιπροσθέτως, επαναλαμβανόμενες μυϊκές βιοψίες από τον ίδιο μυ μπορούν να προκαλέσουν επιπλέον φλεγμονή(Paulsen et al., 2012), και ένας τελευταίος παράγοντας για τον οποίο η ανάλυση έγινε στο αίμα, βασίζεται ξανά στην λογική της χρησιμοποίησης απλών τεχνικών, οι οποίες, στο μέλλον, θα μπορούν να εφαρμοστούν ευρέως.

Παρόλο που είναι γνωστό ότι στον ορό περιέχεται μικρότερη περιεκτικότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων συγκριτικά με τα κυτταρικά συστατικά, και ακόμα μικρότερη ίσως συγκριτικά με το μυϊκό ιστό, η δραστικότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης μετρήθηκε στον ορό, της υπεροξειδικής δισμουτάσης μετρήθηκε τόσο στον ορό όσο και στα λευκοκύτταρα, με την παραδοχή ότι οι μετρήσεις στον ορό αντανακλούν συστημικές αλλαγές, ενώ οι μετρήσεις στα λευκοκύτταρα τις ενδοκυτταρικές αλλαγές. Στη βιβλιογραφία η πλειοψηφία των μελετών έχει εξετάσει τη δράση των συγκεκριμένων ενζύμων στα ερυθροκύτταρα και στο πλάσμα/ορό (Nikolaidis & Jamurtas, 2009).

7.5 Σχολιασμός αποτελεσμάτων μελέτης

Αναφορικά με τα αντιοξειδωτικά ένζυμα που ανιχνεύθηκαν στον ορό (SOD3, GPX3), παρατηρήσαμε τάση αύξησης στη δραστικότητα της SOD και του ορού και των λευκοκυττάρων, κυρίως στις 24 και 48 ώρες μετά την έκκεντρη άσκηση, και καμία μεταβολή στην GPX3. Στην βιβλιογραφία δεν υπάρχουν άλλες μελέτες έκκεντρης άσκησης που να έχουν εξετάσει τα δύο αυτά ένζυμα στον ορό, σε απροπόνητο πληθυσμό. Παρόλα αυτά, μια πρόσφατη μελέτη(Okudan, Belviranli, & Torlak, 2017), με δείγμα αγύμναστους άντρες, που εξέτασε την SOD στα ερυθροκύτταρα μετά από έκκεντρη άσκηση αντιστάσεων στα κάτω άκρα, δε βρήκε καμία μεταβολή, παρόλο που

η CK ήταν αυξημένη. Αντίστοιχη μελέτη, με δείγμα γυναίκες που δεν προπονούνταν συστηματικά, επίσης δεν παρατήρησε αύξηση στην SOD και GPX στα ερυθροκύτταρα, μετά από κατηφορικό τρέξιμο(Koenig et al., 2016). Μια μελέτη, στην οποία το δείγμα ήταν δρομείς κοντινών αποστάσεων (σπρίντερ), εντόπισε αύξηση της SOD αλλά καμία αύξηση της GPX στα ερυθροκύτταρα, 24 ώρες μετά από 4 δοκιμασίες γρήγορου τρεξίματος σε κυκλοεργόμετρο (Jówko, Długołęcka, Makaruk, & Cieśliński, 2015). Βέβαια, και σε άλλες πρόσφατες μελέτες, όπου οι δοκιμαζόμενοι δεν ήταν αγύμναστοι αλλά νέοι αθλητές ή συστηματικά αθλούμενοι, μετά από αερόβια πρωτόκολλα (Djordjevic et al., 2012), ή μετά από έντονη άσκηση αντιστάσεων κάτω άκρων (Levers et al., 2015), η SOD στον ορό δεν αυξήθηκε. Αντίστοιχη μελέτη με αθλητές, μετά από πρωτόκολλο, που συνδύαζε έντονη άσκηση αντιστάσεων- στο 85% της μέγιστης δύναμής τους- και αερόβια- στο 85% του VO_2max τους- δεν ανίχνευσε μεταβολές στη δραστικότητα SOD και GPX στα ερυθροκύτταρα (Bessa, AL, 2016).

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η SOD στον ορό αυξήθηκε μετά το πρωτόκολλο άνω άκρων, αποτέλεσμα το οποίο συνάδει με την αντίστοιχη μεγαλύτερη αύξηση της CK, όμως η SOD στα λευκοκύτταρα αυξήθηκε και με τα δύο πρωτόκολλα άσκησης. Δεν υπάρχει συγκριτική μελέτη, μέχρι στιγμής, η οποία μετά από έκκεντρα πρωτόκολλα ασκήσεων άνω και κάτω άκρων, να εξετάζει την δραστικότητα του συγκεκριμένου αντιοξειδωτικού ενζύμου. Ανασκοπήσεις που συγκρίνουν τις επιδράσεις πρωτοκόλλων ΑΜΒ ανώ και κάτω άκρων, εστιάζουν στο μέγεθος της μυϊκής βλάβης που προκαλείται, και όχι στους δείκτες οξειδωτικού στρες. Συνεπώς δεν υπάρχει κάτι αντίστοιχο στη βιβλιογραφία που να συμφωνεί ή όχι με το συγκεκριμένο αποτέλεσμα.

Τέλος, δεν μπορούμε να βγάλουμε κάποιο συμπέρασμα με κλινική σημασία για τις συχετίσεις που έγιναν, λόγω του μικρού δεόγματος. Μία λογική συσχέτιση που παρατηρήθηκε είναι ότι όσο αυξανόταν η SOD ορού μετά το πρωτόκολλο άνω άκρων, μειωνόταν η δύναμη και αυξανόταν ο πόνος. Σημειώνεται, οτι δεν υπήρξαν συσχετίσεις μεταξύ του διατροφικού προφίλ των εθελοντών (συγκεκριμένες ομάδες τροφίμων και θρεπτικά συστατικά) και των δεικτών οξειδωτικού στρες και μυϊκής βλάβης.

Συμπερασματικά, ήταν η πρώτη συγκριτική μελέτη πρωτοκόλλων άνω και κάτω άκρων, στην οποία εξετάστηκε, πέρα από τους δείκτες μυϊκής βλάβης, και η

δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων τις 48 ώρες μετά την έκκεντρη άσκηση. Βέβαια, ένας περιορισμός της μελέτης ήταν ότι τα δύο πρωτόκολλα δεν είχαν τον ίδιο βαθμό έντασης, αφού η επιβάρυνση ήταν διαφορετική. Στο πρωτόκολλο άνω άκρων η επιβάρυνση αντιστοιχούσε στο 90% της μέγιστης δύναμης των δικεφάλων, έναντι του βάρους του σώματος στο πρωτόκολλο κάτω άκρων, όμως ο σκοπός δεν ήταν να συγκριθούν εργογυσιολογικά τα προωτόκολλα, όσο να βρεθεί ένας απλός τρόπος, με τον οποίο να αυξάνεται η δραστικότητα των αντιοξειωτικών ενζύμων. Πιθανόν, εάν είχε μελετηθεί η δραστηριότητα των ενζύμων στα μυϊκά κύτταρα, θα βρισκόταν πολύ μεγαλύτερη (Ji, 1995).

Το συγκεκριμένο πείραμα αποτελεί μια πρώτη εικόνα για την επίδραση των δύο πρωτοκόλλων στην μυϊκή βλάβη και στο οξειδωτικό στρες. Έγινε ξεκάθαρο ότι η κινητική της δραστικότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων, κατά την ΑΜΒ, είναι διαφορετική μετά το κάθε πρωτόκολλο και διαφέρει σημαντικά μεταξύ ορού και κυτταρικών σωματιδίων του αίματος.

Η δραστικότητα της κυκλοφορούσας και λευκοκυτταρικής υπεροξειδικής δισμουτάσης αυξήθηκε πιθανότατα ως ομοιοστατικός μηχανισμός του οργανισμού στο ασκησιογενές οξειδωτικό στρες. Συνεπώς η μέτρηση των ενζύμων αυτών μετά από πρόκληση ΑΜΒ θα μπορούσε να αποτελέσει μελλοντικά τρόπο εκτίμησης του ενδογενούς αντιοξειδωτικού δυναμικού του ανθρώπινου οργανισμού. Όμως, προκειμένου να μπορέσουμε να εξάγουμε ασφαλή συμπεράσματα, είναι απαραίτητο να αυξηθεί ο αριθμός δείγματος, ώστε να μην εμφανίζονται τόσο μεγάλες διακυμάνσεις στα αποτελέσματα και μελετηθούν κι άλλοι δείκτες οξειδωτικού στρες στον ορό αλλά και σε όλα τα κυτταρικά συστατικά.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abou-Khalil, R., Mounier, R., & Chazaud, B. (2010). Regulation of myogenic stem cell behavior by vessel cells: the "menage a trois" of satellite cells, periendothelial cells and endothelial cells. *Cell Cycle, 9*(5), 892-896. doi: 10.4161/cc.9.5.10851

Ainsworth, B. E., Haskell, W. L., Whitt, M. C., Irwin, M. L., Swartz, A. M., Strath, S. J., . . . Leon, A. S. (2000). Compendium of physical activities: an update of activity codes and MET intensities. *Med Sci Sports Exerc, 32*(9 Suppl), S498-504.

Alleman, R. J., Katunga, L. A., Nelson, M. A. M., Brown, D. A., & Anderson, E. J. (2014). The "Goldilocks Zone" from a redox perspective—Adaptive vs. deleterious responses to oxidative stress in striated muscle. *Frontiers in Physiology, 5*, 358. doi: 10.3389/fphys.2014.00358

Allen, D. G., Whitehead, N. P., & Yeung, E. W. (2005). Mechanisms of stretch-induced muscle damage in normal and dystrophic muscle: role of ionic changes. *The Journal of Physiology, 567*(Pt 3), 723-735. doi: 10.1113/jphysiol.2005.091694

Armstrong, R. B. (1984). Mechanisms of exercise-induced delayed onset muscular soreness: a brief review. *Med Sci Sports Exerc, 16*(6), 529-538.

Arnold, L., Henry, A., Poron, F., Baba-Amer, Y., van Rooijen, N., Plonquet, A., . . . Chazaud, B. (2007). Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med, 204*(5), 1057-1069. doi: 10.1084/jem.20070075

Asmussen, E. (1956). Observations on Experimental Muscular Soreness. *Acta Rheumatologica Scandinavica, 2*(1-4), 109-116. doi: 10.3109/rhe1.1956.2.issue-1-4.12

Bailey, D. M., Lawrenson, L., McEneny, J., Young, I. S., James, P. E., Jackson, S. K., . . . Richardson, R. S. (2007). Electron paramagnetic spectroscopic evidence of exercise-induced free radical accumulation in human skeletal muscle. *Free Radic Res, 41*(2), 182-190. doi: 10.1080/10715760601028867

Bambaeichi, E., Reilly, T., Cable, N. T., & Giacomoni, M. (2004). The isolated and combined effects of menstrual cycle phase and time-of-day on muscle strength of eumenorrheic females. *Chronobiol Int, 21*(4-5), 645-660.

Bell, P. G., McHugh, M. P., Stevenson, E., & Howatson, G. (2014). The role of cherries in exercise and health. *Scand J Med Sci Sports, 24*(3), 477-490. doi: 10.1111/sms.12085

Bermon, S., Philip, P., Candito, M., Ferrari, P., & Dolisi, C. (2001). Effects of strength exercise and training on the natural killer cell counts in elderly humans. *J Sports Med Phys Fitness, 41*(2), 196-202.

Bessa, A. L., Oliveira, V. N., Agostini, G. G., Oliveira, R. J., Oliveira, A. C., White, G. E., . . . Espindola, F. S. (2016). Exercise Intensity and Recovery: Biomarkers of Injury, Inflammation, and Oxidative Stress. *J Strength Cond Res, 30*(2), 311-319. doi: 10.1519/JSC.0b013e31828f1ee9

Betteridge, D. J. (2000). What is oxidative stress? *Metabolism, 49*(2), 3-8. doi: http://dx.doi.org/10.1016/S0026-0495(00)80077-3

Bowtell, J. L., Sumners, D. P., Dyer, A., Fox, P., & Mileva, K. N. (2011). Montmorency cherry juice reduces muscle damage caused by intensive strength exercise. *Med Sci Sports Exerc, 43*(8), 1544-1551. doi: 10.1249/MSS.0b013e31820e5adc

Brancaccio, P., Lippi, G., & Maffulli, N. (2010). Biochemical markers of muscular damage. *Clin Chem Lab Med, 48*(6), 757-767. doi: 10.1515/cclm.2010.179

Buzina, R., & Suboticanec, K. (1985). Vitamin C and physical working capacity. *Int J Vitam Nutr Res Suppl, 27*, 157-166.

Byrne, C., Twist, C., & Eston, R. (2004). Neuromuscular function after exercise-induced muscle damage: theoretical and applied implications. *Sports Med, 34*(1), 49-69.

Camus, G., Felekidis, A., Pincemail, J., Deby-Dupont, G., Deby, C., Juchmes-Ferir, A., . . . Lamy, M. (1994). Blood levels of reduced/oxidized glutathione and plasma concentration of ascorbic acid during eccentric and concentric exercises of similar energy cost. *Arch Int Physiol Biochim Biophys, 102*(1), 67-70.

Carlson, L. A., Headley, S., DeBruin, J., Tuckow, A. T., Koch, A. J., & Kenefick, R. W. (2008). Carbohydrate supplementation and immune responses after acute exhaustive resistance exercise. *Int J Sport Nutr Exerc Metab, 18*(3), 247-259.

Castrogiovanni, P., & Imbesi, R. (2012). Oxidative stress and skeletal muscle in exercise. *Ital J Anat Embryol, 117*(2), 107-117.

Chapman, T. M., Kim, H. J., & Min, D. B. (2009). Prooxidant activity of oxidized alpha-tocopherol in vegetable oils. *J Food Sci, 74*(7), C536-542. doi: 10.1111/j.1750-3841.2009.01262.x

Clarkson, P. M., & Ebbeling, C. (1988). Investigation of serum creatine kinase variability after muscle-damaging exercise. *Clin Sci (Lond), 75*(3), 257-261.

Clarkson, P. M., & Hubal, M. J. (2002). Exercise-induced muscle damage in humans. *Am J Phys Med Rehabil, 81*(11 Suppl), S52-69. doi: 10.1097/01.phm.0000029772.45258.43

Clarkson, P. M., & Tremblay, I. (1988). Exercise-induced muscle damage, repair, and adaptation in humans. *J Appl Physiol (1985), 65*(1), 1-6.

Cockburn, E., Stevenson, E., Hayes, P. R., Robson-Ansley, P., & Howatson, G. (2010). Effect of milk-based carbohydrate-protein supplement timing on the attenuation of exercise-induced muscle damage. *Appl Physiol Nutr Metab, 35*(3), 270-277. doi: 10.1139/h10-017

Connolly, D. A., Sayers, S. P., & McHugh, M. P. (2003). Treatment and prevention of delayed onset muscle soreness. *J Strength Cond Res, 17*(1), 197-208.

Connolly, D. A. J., McHugh, M. P., & Padilla-Zakour, O. I. (2006). Efficacy of a tart cherry juice blend in preventing the symptoms of muscle damage. *British Journal of Sports Medicine, 40*(8), 679-683. doi: 10.1136/bjsm.2005.025429

Corona, B. T., Balog, E. M., Doyle, J. A., Rupp, J. C., Luke, R. C., & Ingalls, C. P. (2010). Junctophilin damage contributes to early strength deficits and EC coupling failure after eccentric contractions. *Am J Physiol Cell Physiol, 298*(2), C365-376. doi: 10.1152/ajpcell.00365.2009

Crozier, S. J., Kimball, S. R., Emmert, S. W., Anthony, J. C., & Jefferson, L. S. (2005). Oral leucine administration stimulates protein synthesis in rat skeletal muscle. *J Nutr, 135*(3), 376-382.

Diaz-Castro, J., Guisado, R., Kajarabille, N., Garcia, C., Guisado, I. M., de Teresa, C., & Ochoa, J. J. (2012). Coenzyme Q(10) supplementation ameliorates inflammatory signaling and oxidative stress associated with strenuous exercise. *Eur J Nutr, 51*(7), 791-799. doi: 10.1007/s00394-011-0257-5

Diaz-Vegas, A., Campos, C. A., Contreras-Ferrat, A., Casas, M., Buvinic, S., Jaimovich, E., & Espinosa, A. (2015). ROS Production via P2Y1-PKC-NOX2 Is Triggered by Extracellular ATP after Electrical Stimulation of Skeletal Muscle Cells. *PLoS One, 10*(6), e0129882. doi: 10.1371/journal.pone.0129882

Dillard, C. J., Litov, R. E., Savin, W. M., Dumelin, E. E., & Tappel, A. L. (1978). Effects of exercise, vitamin E, and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol, 45*(6), 927-932.

Djordjevic, B., Baralic, I., Kotur-Stevuljevic, J., Stefanovic, A., Ivanisevic, J., Radivojevic, N., . . . Dikic, N. (2012). Effect of astaxanthin supplementation on muscle damage and oxidative stress markers in elite young soccer players. *J Sports Med Phys Fitness, 52*(4), 382-392.

Enoka, R. M. (1996). Eccentric contractions require unique activation strategies by the nervous system. *J Appl Physiol (1985), 81*(6), 2339-2346.

Espinosa, A., Henriquez-Olguin, C., & Jaimovich, E. (2016). Reactive oxygen species and calcium signals in skeletal muscle: A crosstalk involved in both normal signaling and disease. *Cell Calcium, 60*(3), 172-179. doi: 10.1016/j.ceca.2016.02.010

Febbraio, M. A., Steensberg, A., Starkie, R. L., McConell, G. K., & Kingwell, B. A. Skeletal muscle interleukin-6 and tumor necrosis factor-α release in healthy subjects and patients with type 2 diabetes at rest and during exercise. *Metabolism - Clinical and Experimental, 52*(7), 939-944. doi: 10.1016/S0026-0495(03)00105-7

Fischer, C. P., Hiscock, N. J., Penkowa, M., Basu, S., Vessby, B., Kallner, A., . . . Pedersen, B. K. (2004). Supplementation with vitamins C and E inhibits the release of interleukin-6 from contracting human skeletal muscle. *J Physiol, 558*(Pt 2), 633-645. doi: 10.1113/jphysiol.2004.066779

Fisher-Wellman, K., & Bloomer, R. J. (2009). Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dyn Med, 8*, 1. doi: 10.1186/1476-5918-8-1

Fogarty, M. C., Devito, G., Hughes, C. M., Burke, G., Brown, J. C., McEneny, J., . . . Davison, G. W. (2013). Effects of alpha-lipoic acid on mtDNA damage after isolated muscle contractions. *Med Sci Sports Exerc, 45*(8), 1469-1477. doi: 10.1249/MSS.0b013e31828bf31e

Freidenreich, D. J., & Volek, J. S. (2012). Immune responses to resistance exercise. *Exerc Immunol Rev, 18*, 8-41.

Friden, J., Sfakianos, P. N., & Hargens, A. R. (1986). Muscle soreness and intramuscular fluid pressure: comparison between eccentric and concentric load. *J Appl Physiol (1985), 61*(6), 2175-2179.

Friden, J., Sjostrom, M., & Ekblom, B. (1983). Myofibrillar damage following intense eccentric exercise in man. *Int J Sports Med, 4*(3), 170-176.

Hadi, A., Pourmasoumi, M., Kafeshani, M., Karimian, J., Maracy, M. R., & Entezari, M. H. (2017). The Effect of Green Tea and Sour Tea (Hibiscus sabdariffa L.) Supplementation on Oxidative Stress and Muscle Damage in Athletes. *J Diet Suppl, 14*(3), 346-357. doi: 10.1080/19390211.2016.1237400

Hagstromer, M., Oja, P., & Sjostrom, M. (2006). The International Physical Activity Questionnaire (IPAQ): a study of concurrent and construct validity. *Public Health Nutr, 9*(6), 755-762.

Halliwell, B. (1996). Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant in vivo? *Free Radic Res, 25*(5), 439-454.

Hawley, J. A., Tipton, K. D., & Millard-Stafford, M. L. (2006). Promoting training adaptations through nutritional interventions. *J Sports Sci, 24*(7), 709-721. doi: 10.1080/02640410500482727

Hough, T. (1900). ERGOGRAPHIC STUDIES IN MUSCULAR FATIGUE AND SORENESS. *Journal of the Boston Society of Medical Sciences, 5*(3), 81-92.

Howatson, G., Hoad, M., Goodall, S., Tallent, J., Bell, P. G., & French, D. N. (2012). Exercise-induced muscle damage is reduced in resistance-trained males by branched chain amino acids: a randomized, double-blind, placebo controlled study. *J Int Soc Sports Nutr, 9*(1), 20. doi: 10.1186/1550-2783-9-20

Howatson, G., & van Someren, K. A. (2008). The Prevention and Treatment of Exercise-Induced Muscle Damage. *Sports Medicine, 38*(6), 483-503. doi: 10.2165/00007256-200838060-00004

Hurley, C. F., Hatfield, D. L., & Riebe, D. A. (2013). The effect of caffeine ingestion on delayed onset muscle soreness. *J Strength Cond Res, 27*(11), 3101-3109. doi: 10.1519/JSC.0b013e3182a99477

Hyldahl, R. D., & Hubal, M. J. (2014). Lengthening our perspective: morphological, cellular, and molecular responses to eccentric exercise. *Muscle Nerve, 49*(2), 155-170. doi: 10.1002/mus.24077

Jarvinen, T. A., Jarvinen, T. L., Kaariainen, M., Kalimo, H., & Jarvinen, M. (2005). Muscle injuries: biology and treatment. *Am J Sports Med, 33*(5), 745-764. doi: 10.1177/0363546505274714

Ji, L. L. (1995). Exercise and oxidative stress: role of the cellular antioxidant systems. *Exerc Sport Sci Rev, 23*, 135-166.

Ji, L. L. (2015). Redox signaling in skeletal muscle: role of aging and exercise. *Adv Physiol Educ, 39*(4), 352-359. doi: 10.1152/advan.00106.2014

Jówko, E., Długołęcka, B., Makaruk, B., & Cieśliński, I. (2015). The effect of green tea extract supplementation on exercise-induced oxidative stress parameters in male sprinters. *Eur J Nutr, 54*(5), 783-791. doi: 10.1007/s00394-014-0757-1

Kerksick, C. M., Kreider, R. B., & Willoughby, D. S. (2010). Intramuscular adaptations to eccentric exercise and antioxidant supplementation. *Amino Acids, 39*(1), 219-232. doi: 10.1007/s00726-009-0432-7

Kerksick, C. M., Willoughby, D., Kouretas, D., & Tsatsakis, A. (2013). Intramuscular responses with muscle damaging exercise and the interplay between multiple intracellular networks: a human perspective. *Food Chem Toxicol, 61*, 136-143. doi: 10.1016/j.fct.2013.04.029

Kim, J., & Lee, J. (2014). A review of nutritional intervention on delayed onset muscle soreness. Part I. *Journal of Exercise Rehabilitation, 10*(6), 349-356. doi: 10.12965/jer.140179

Koenig, R. T., Dickman, J. R., Kang, C. H., Zhang, T., Chu, Y. F., & Ji, L. L. (2016). Avenanthramide supplementation attenuates eccentric exercise-inflicted blood inflammatory markers in women. *Eur J Appl Physiol, 116*(1), 67-76. doi: 10.1007/s00421-015-3244-3

Kon, M., Tanabe, K., Akimoto, T., Kimura, F., Tanimura, Y., Shimizu, K., . . . Kono, I. (2008). Reducing exercise-induced muscular injury in kendo athletes with supplementation of coenzyme Q10. *Br J Nutr, 100*(4), 903-909. doi: 10.1017/s0007114508926544

Kotsis, Y., Mikellidi, A., Aresti, C., Persia, E., Sotiropoulos, A., Panagiotakos, D. B., . . . Nomikos, T. (2017). A low-dose, 6-week bovine colostrum supplementation maintains performance and attenuates inflammatory indices following a Loughborough Intermittent Shuttle Test in soccer players. doi: 10.1007/s00394-017-1401-7

Kris-Etherton, P. M., Grieger, J. A., & Etherton, T. D. Dietary reference intakes for DHA and EPA. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 81*(2), 99-104. doi: 10.1016/j.plefa.2009.05.011

Landau, M. E., Kenney, K., Deuster, P., & Campbell, W. (2012). Exertional rhabdomyolysis: a clinical review with a focus on genetic influences. *J Clin Neuromuscul Dis, 13*(3), 122-136. doi: 10.1097/CND.0b013e31822721ca

Lehti, T. M., Kalliokoski, R., & Komulainen, J. (2007). Repeated bout effect on the cytoskeletal proteins titin, desmin, and dystrophin in rat skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil, 28*(1), 39-47. doi: 10.1007/s10974-007-9102-0

Levers, K., Dalton, R., Galvan, E., Goodenough, C., O'Connor, A., Simbo, S., . . . Kreider, R. B. (2015). Effects of powdered Montmorency tart cherry supplementation on an acute bout of intense lower body strength exercise in resistance trained males. *J Int Soc Sports Nutr, 12*, 41. doi: 10.1186/s12970-015-0102-y

Lieber, R. L., & Friden, J. (2002). Morphologic and mechanical basis of delayed-onset muscle soreness. *J Am Acad Orthop Surg, 10*(1), 67-73.

Mackey, A. L., Brandstetter, S., Schjerling, P., Bojsen-Moller, J., Qvortrup, K., Pedersen, M. M., . . . Langberg, H. (2011). Sequenced response of extracellular matrix deadhesion and fibrotic regulators after muscle damage is involved in protection against future injury in human skeletal muscle. *The FASEB Journal, 25*(6), 1943-1959. doi: 10.1096/fj.10-176487

Malm, C., Svensson, M., Sjoberg, B., Ekblom, B., & Sjodin, B. (1996). Supplementation with ubiquinone-10 causes cellular damage during intense exercise. *Acta Physiol Scand, 157*(4), 511-512. doi: 10.1046/j.1365-201X.1996.534286000.x

Maridakis, V., O'Connor, P. J., Dudley, G. A., & McCully, K. K. (2007). Caffeine attenuates delayed-onset muscle pain and force loss following eccentric exercise. *J Pain, 8*(3), 237-243. doi: 10.1016/j.jpain.2006.08.006

Mason, S., & Wadley, G. D. (2014). Skeletal muscle reactive oxygen species: a target of good cop/bad cop for exercise and disease. *Redox Rep, 19*(3), 97-106. doi: 10.1179/1351000213y.0000000077

Mayhew, D. L., Thyfault, J. P., & Koch, A. J. (2005). Rest-interval length affects leukocyte levels during heavy resistance exercise. *J Strength Cond Res, 19*(1), 16-22. doi: 10.1519/r-14113.1

McCully, K. K., & Faulkner, J. A. (1986). Characteristics of lengthening contractions associated with injury to skeletal muscle fibers. *J Appl Physiol (1985), 61*(1), 293-299.

McCune, L. M., Kubota, C., Stendell-Hollis, N. R., & Thomson, C. A. (2011). Cherries and health: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr, 51*(1), 1-12. doi: 10.1080/10408390903001719

McHugh, M. P., Connolly, D. A., Eston, R. G., & Gleim, G. W. (1999). Exercise-induced muscle damage and potential mechanisms for the repeated bout effect. *Sports Med, 27*(3), 157-170.

McHugh, M. P., Connolly, D. A., Eston, R. G., & Gleim, G. W. (2000). Electromyographic analysis of exercise resulting in symptoms of muscle damage. *J Sports Sci, 18*(3), 163-172. doi: 10.1080/026404100365063

McLeay, Y., Stannard, S., Houltham, S., & Starck, C. (2017). Dietary thiols in exercise: oxidative stress defence, exercise performance, and adaptation. *J Int Soc Sports Nutr, 14*, 12. doi: 10.1186/s12970-017-0168-9

Melo, F., Carey, D. J., & Brandan, E. (1996). Extracellular matrix is required for skeletal muscle differentiation but not myogenin expression. *J Cell Biochem, 62*(2), 227-239. doi: 10.1002/(SICI)1097-4644(199608)62:2<227::AID-JCB11>3.0.CO;2-I

Mickleborough, T. D. (2013). Omega-3 polyunsaturated fatty acids in physical performance optimization. *Int J Sport Nutr Exerc Metab, 23*(1), 83-96.

Mitchell, J. B. (2013). Ingestion of carbohydrate during recovery in exercising people. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 16*(4), 461-465. doi: 10.1097/MCO.0b013e328361c526

Moore, D. R., Young, M., & Phillips, S. M. (2012). Similar increases in muscle size and strength in young men after training with maximal shortening or lengthening contractions when matched for total work. *Eur J Appl Physiol, 112*(4), 1587-1592. doi: 10.1007/s00421-011-2078-x

Morgan, D. L., & Allen, D. G. (1999). Early events in stretch-induced muscle damage. *J Appl Physiol (1985), 87*(6), 2007-2015.

Munn, J., Herbert, R. D., & Gandevia, S. C. (2004). Contralateral effects of unilateral resistance training: a meta-analysis. *J Appl Physiol (1985), 96*(5), 1861-1866. doi: 10.1152/japplphysiol.00541.2003

Myburgh, K. H. (2014). Polyphenol supplementation: benefits for exercise performance or oxidative stress? *Sports Med, 44 Suppl 1*, S57-70. doi: 10.1007/s40279-014-0151-4

Nakhostin-Roohi, B., Babaei, P., Rahmani-Nia, F., & Bohlooli, S. (2008). Effect of vitamin C supplementation on lipid peroxidation, muscle damage and inflammation after 30-min exercise at 75% VO2max. *J Sports Med Phys Fitness, 48*(2), 217-224.

Newham, D. J., Jones, D. A., & Edwards, R. H. (1983). Large delayed plasma creatine kinase changes after stepping exercise. *Muscle Nerve, 6*(5), 380-385. doi: 10.1002/mus.880060507

Nieman, D. C., Henson, D. A., Davis, J. M., Angela Murphy, E., Jenkins, D. P., Gross, S. J., . . . Mayer, E. P. (2007). Quercetin's influence on exercise-induced changes in plasma cytokines and muscle and leukocyte cytokine mRNA. *Journal of Applied Physiology, 103*(5), 1728-1735. doi: 10.1152/japplphysiol.00707.2007

Nieman, D. C., Henson, D. A., Davis, J. M., Dumke, C. L., Gross, S. J., Jenkins, D. P., . . . Mayer, E. P. (2007). Quercetin ingestion does not alter cytokine changes in athletes competing in the Western States Endurance Run. *J Interferon Cytokine Res, 27*(12), 1003-1011. doi: 10.1089/jir.2007.0050

Nikolaidis, M. G., & Jamurtas, A. Z. (2009). Blood as a reactive species generator and redox status regulator during exercise. *Arch Biochem Biophys, 490*(2), 77-84. doi: 10.1016/j.abb.2009.08.015

Nishita, T., Ohohashi, T., & Asari, M. (1995). Determination of carbonic anhydrase III isoenzyme concentration in sera of racehorses with exertional rhabdomyolysis. *Am J Vet Res, 56*(2), 162-166.

O'Fallon, K. S., Kaushik, D., Michniak-Kohn, B., Dunne, C. P., Zambraski, E. J., & Clarkson, P. M. (2012). Effects of quercetin supplementation on markers of muscle damage and inflammation after eccentric exercise. *Int J Sport Nutr Exerc Metab, 22*(6), 430-437.

Okudan, N., Belviranli, M., & Torlak, S. (2017). Coenzyme Q10 does not prevent exercise induced muscle damage and oxidative stress in sedentary men. *J Sports Med Phys Fitness*. doi: 10.23736/s0022-4707.17.07146-8

Ostman, B., Sjodin, A., Michaelsson, K., & Byberg, L. (2012). Coenzyme Q10 supplementation and exercise-induced oxidative stress in humans. *Nutrition, 28*(4), 403-417. doi: 10.1016/j.nut.2011.07.010

Panagiotakos, D. B., Pitsavos, C., Arvaniti, F., & Stefanadis, C. (2007). Adherence to the Mediterranean food pattern predicts the prevalence of hypertension, hypercholesterolemia, diabetes and obesity, among healthy adults; the accuracy of the MedDietScore. *Prev Med, 44*(4), 335-340. doi: 10.1016/j.ypmed.2006.12.009

Panza, V. P., Diefenthaeler, F., Tamborindeguy, A. C., Camargo Cde, Q., de Moura, B. M., Brunetta, H. S., . . . da Silva, E. L. (2016). Effects of mate tea consumption on muscle strength and oxidative stress markers after eccentric exercise. *Br J Nutr, 115*(8), 1370-1378. doi: 10.1017/s000711451600043x

Patel, S., & Rauf, A. (2017). Adaptogenic herb ginseng (Panax) as medical food: Status quo and future prospects. *Biomed Pharmacother, 85*, 120-127. doi: 10.1016/j.biopha.2016.11.112

Paulsen, G., Lauritzen, F., Bayer, M. L., Kalhovde, J. M., Ugelstad, I., Owe, S. G., . . . Raastad, T. (2009). Subcellular movement and expression of HSP27, alphaB-crystallin, and HSP70 after two bouts of eccentric exercise in humans. *J Appl Physiol (1985), 107*(2), 570-582. doi: 10.1152/japplphysiol.00209.2009

Paulsen, G., Mikkelsen, U. R., Raastad, T., & Peake, J. M. (2012). Leucocytes, cytokines and satellite cells: what role do they play in muscle damage and regeneration following eccentric exercise? *Exerc Immunol Rev, 18*, 42-97.

Peake, J. M., Della Gatta, P., Suzuki, K., & Nieman, D. C. (2015). Cytokine expression and secretion by skeletal muscle cells: regulatory mechanisms and exercise effects. *Exerc Immunol Rev, 21*, 8-25.

Pedersen, B. K. (2011). Muscles and their myokines. *J Exp Biol, 214*(Pt 2), 337-346. doi: 10.1242/jeb.048074

Petersen, A. M., & Pedersen, B. K. (2005). The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol (1985), 98*(4), 1154-1162. doi: 10.1152/japplphysiol.00164.2004

Phillips, S. M. (2010). The science of muscle hypertrophy: making dietary protein count. *Proceedings of the Nutrition Society, 70*(1), 100-103. doi: 10.1017/S002966511000399X

Pizza, F. X., Koh, T. J., McGregor, S. J., & Brooks, S. V. (2002). Muscle inflammatory cells after passive stretches, isometric contractions, and lengthening contractions. *J Appl Physiol (1985), 92*(5), 1873-1878. doi: 10.1152/japplphysiol.01055.2001

Powers, S. K., & Jackson, M. J. (2008). Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev, 88*(4), 1243-1276. doi: 10.1152/physrev.00031.2007

Powers, S. K., Nelson, W. B., & Hudson, M. B. (2011). Exercise-induced oxidative stress in humans: cause and consequences. *Free Radic Biol Med, 51*(5), 942-950. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.12.009

Proske, U., & Allen, T. J. (2005). Damage to Skeletal Muscle from Eccentric Exercise. *Exerc Sport Sci Rev, 33*(2), 98-104.

Pumpa, K. L., Fallon, K. E., Bensoussan, A., & Papalia, S. (2013). The effects of Panax notoginseng on delayed onset muscle soreness and muscle damage in well-trained males: a double blind randomised controlled trial. *Complement Ther Med, 21*(3), 131-140. doi: 10.1016/j.ctim.2012.12.007

Ra, S. G., Miyazaki, T., Ishikura, K., Nagayama, H., Komine, S., Nakata, Y., . . . Ohmori, H. (2013). Combined effect of branched-chain amino acids and taurine supplementation on delayed onset muscle soreness and muscle damage in high-intensity eccentric exercise. *J Int Soc Sports Nutr, 10*(1), 51. doi: 10.1186/1550-2783-10-51

Radak, Z., Naito, H., Taylor, A. W., & Goto, S. (2012). Nitric oxide: is it the cause of muscle soreness? *Nitric Oxide, 26*(2), 89-94. doi: 10.1016/j.niox.2011.12.005

Radak, Z., Pucsok, J., Mecseki, S., Csont, T., & Ferdinandy, P. (1999). Muscle soreness-induced reduction in force generation is accompanied by increased nitric oxide content and DNA damage in human skeletal muscle. *Free Radic Biol Med, 26*(7-8), 1059-1063.

Ryan, A. M., Reynolds, J. V., Healy, L., Byrne, M., Moore, J., Brannelly, N., . . . Flood, P. (2009). Enteral nutrition enriched with eicosapentaenoic acid (EPA) preserves lean body mass following esophageal cancer surgery: results of a double-blinded randomized controlled trial. *Ann Surg, 249*(3), 355-363. doi: 10.1097/SLA.0b013e31819a4789

S. Thiebaud, R. (2012). Exercise-Induced Muscle Damage: Is it detrimental or beneficial? *Journal of Trainology, 1*(2), 36-44. doi: 10.17338/trainology.1.2_36

Sakellariou, G. K., Vasilaki, A., Palomero, J., Kayani, A., Zibrik, L., McArdle, A., & Jackson, M. J. (2013). Studies of Mitochondrial and Nonmitochondrial Sources Implicate Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase(s) in the Increased Skeletal Muscle Superoxide Generation That Occurs During Contractile Activity. *Antioxidants & Redox Signaling, 18*(6), 603-621. doi: 10.1089/ars.2012.4623

Sayers, S. P., & Clarkson, P. M. (2002). Exercise-induced Rhabdomyolysis. *Curr Sports Med Rep, 1*(2), 59-60.

Sayers, S. P., Knight, C. A., Clarkson, P. M., Van Wegen, E. H., & Kamen, G. (2001). Effect of ketoprofen on muscle function and sEMG activity after eccentric exercise. *Med Sci Sports Exerc, 33*(5), 702-710.

Schwane, J. A., Johnson, S. R., Vandenakker, C. B., & Armstrong, R. B. (1983). Delayed-onset muscular soreness and plasma CPK and LDH activities after downhill running. *Med Sci Sports Exerc, 15*(1), 51-56.

Schwane, J. A., Watrous, B. G., Johnson, S. R., & Armstrong, R. B. (1983). Is Lactic Acid Related to Delayed-Onset Muscle Soreness? *Phys Sportsmed, 11*(3), 124-131. doi: 10.1080/00913847.1983.11708485

Silva, L. A., Pinho, C. A., Silveira, P. C. L., Tuon, T., De Souza, C. T., Dal-Pizzol, F., & Pinho, R. A. (2009). Vitamin E supplementation decreases muscular and oxidative damage but not inflammatory response induced by eccentric contraction. *The Journal of Physiological Sciences, 60*(1), 51. doi: 10.1007/s12576-009-0065-3

Silva, L. A., Silveira, P. C., Ronsani, M. M., Souza, P. S., Scheffer, D., Vieira, L. C., . . . Pinho, R. A. (2011). Taurine supplementation decreases oxidative stress in skeletal muscle after eccentric exercise. *Cell Biochem Funct, 29*(1), 43-49. doi: 10.1002/cbf.1716

Simopoulos, A. P. (2007). Omega-3 fatty acids and athletics. *Curr Sports Med Rep, 6*(4), 230-236.

Smith, L. L. (1991). Acute inflammation: the underlying mechanism in delayed onset muscle soreness? *Med Sci Sports Exerc, 23*(5), 542-551.

Sousa, M., Teixeira, V. H., & Soares, J. (2014). Dietary strategies to recover from exercise-induced muscle damage. *Int J Food Sci Nutr, 65*(2), 151-163. doi: 10.3109/09637486.2013.849662

Starbuck, C., & Eston, R. G. (2012). Exercise-induced muscle damage and the repeated bout effect: evidence for cross transfer. *Eur J Appl Physiol, 112*(3), 1005-1013. doi: 10.1007/s00421-011-2053-6

Stauber, W. T. (1989). Eccentric action of muscles: physiology, injury, and adaptation. *Exerc Sport Sci Rev, 17*, 157-185.

Steensberg, A., Febbraio, M. A., Osada, T., Schjerling, P., van Hall, G., Saltin, B., & Pedersen, B. K. (2001). Interleukin-6 production in contracting human skeletal muscle is influenced by pre-exercise muscle glycogen content. *J Physiol, 537*(Pt 2), 633-639.

Steensberg, A., Keller, C., Starkie, R. L., Osada, T., Febbraio, M. A., & Pedersen, B. K. (2002). IL-6 and TNF-alpha expression in, and release from, contracting human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab, 283*(6), E1272-1278. doi: 10.1152/ajpendo.00255.2002

Su, Q. S., Tian, Y., Zhang, J. G., & Zhang, H. (2008). Effects of allicin supplementation on plasma markers of exercise-induced muscle damage, IL-6 and antioxidant capacity. *Eur J Appl Physiol, 103*(3), 275-283. doi: 10.1007/s00421-008-0699-5

Theodorou, A. A., Nikolaidis, M. G., Paschalis, V., Koutsias, S., Panayiotou, G., Fatouros, I. G., . . . Jamurtas, A. Z. (2011). No effect of antioxidant supplementation on muscle performance and blood redox status adaptations to eccentric training. *Am J Clin Nutr, 93*(6), 1373-1383. doi: 10.3945/ajcn.110.009266

Tidball, J. G., & Villalta, S. A. (2010). Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 298*(5), R1173-1187. doi: 10.1152/ajpregu.00735.2009

Trichopoulou, A., Gnardellis, C., Lagiou, A., Benetou, V., Naska, A., & Trichopoulos, D. (2001). Physical activity and energy intake selectively predict the waist-to-hip ratio in men but not in women. *Am J Clin Nutr, 74*(5), 574-578.

Trombold, J. R., Reinfeld, A. S., Casler, J. R., & Coyle, E. F. (2011). The effect of pomegranate juice supplementation on strength and soreness after eccentric exercise. *J Strength Cond Res, 25*(7), 1782-1788. doi: 10.1519/JSC.0b013e318220d992

Vissing, K., Overgaard, K., Nedergaard, A., Fredsted, A., & Schjerling, P. (2008). Effects of concentric and repeated eccentric exercise on muscle damage and calpain-calpastatin gene expression in human skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol, 103*(3), 323-332. doi: 10.1007/s00421-008-0709-7

Warren, G. L., Ingalls, C. P., Lowe, D. A., & Armstrong, R. B. (2001). Excitation-contraction uncoupling: major role in contraction-induced muscle injury. *Exerc Sport Sci Rev, 29*(2), 82-87.

Welc, S. S., & Clanton, T. L. (2013). The regulation of interleukin-6 implicates skeletal muscle as an integrative stress sensor and endocrine organ. *Exp Physiol, 98*(2), 359-371. doi: 10.1113/expphysiol.2012.068189

Whitehead, N. P., Morgan, D. L., Gregory, J. E., & Proske, U. (2003). Rises in whole muscle passive tension of mammalian muscle after eccentric contractions at different lengths. *J Appl Physiol (1985), 95*(3), 1224-1234. doi: 10.1152/japplphysiol.00163.2003

Zembron-Lacny, A., Ostapiuk, J., & Szyszka, K. (2009). Effects of sulphur-containing compounds on plasma redox status in muscle-damaging exercise. *Chin J Physiol, 52*(5), 289-294.

Zembron-Lacny, A., Slowinska-Lisowska, M., Szygula, Z., Witkowski, K., Stefaniak, T., & Dziubek, W. (2009). Assessment of the antioxidant effectiveness of alpha-lipoic acid in healthy men exposed to muscle-damaging exercise. *J Physiol Pharmacol, 60*(2), 139-143.