

PROTOCOLLO DI STUDIO

Bed rest SBI 2023

Referente: Prof. dr. Boštjan Šimunič
E-mail: bostjan.simunic@zrs-kp.si
Cell.: +386 31 832 016

Titolo di lavoro: BED REST SBI 2023

Medico responsabile: doc. dr. Mladen Gasparini, MD.

Inizio dello studio: 1.9.2023

Fine dello studio: 1.11.2023

Finanziamento dello studio:

- Progetto ARIS (responsabile: prof. dr. Boštjan Šimunič; J5-4593 Physical inactivity induced neuromuscular impairment: comparison of younger and older adults),
- Progetto PRIN (responsabile: prof. dr. Marco Narici; InactivAge – Inactivity induced neuromuscular impairment through different ages: from children, to young and middle age adults) e
- Progetto INTERREG SLO-ITA (responsabile: prof. dr. Gianni Biolo, MD, e coordinatore dello studio prof. dr. Rado Pišot; X-BRAIN.net – Rete di collaborazione transfrontaliera per la riabilitazione dei pazienti colpiti da ictus mediante tecnologie innovative).

Aggiornamento del protocollo clinico MEMORI.net:

Il protocollo clinico MEMORI.net sarà aggiornato sulla base delle nuove evidenze scientifiche relative agli effetti dell'inattività fisica di breve durata sulla salute. Valuteremo scientificamente il deterioramento dello stato di salute nel corso di 10 giorni di inattività fisica, con e senza interventi. Gli interventi si baseranno sia su stimoli cognitivi sia sulla supplementazione nutrizionale.

I periodi brevi (<10 giorni) di inattività fisica sono molto frequenti dopo un ictus. In tale fase

vengono completati gli accertamenti diagnostici e i pazienti si trovano ad affrontare un notevole stress psicologico. Proprio questo periodo sembra tuttavia determinante per il deterioramento secondario dello stato di salute e ritarda il trattamento dell'ictus primario, con possibili ripercussioni sulla prognosi e sui risultati della riabilitazione. Anche periodi molto brevi di inattività fisica hanno un impatto negativo sulla salute, in particolare nelle persone anziane e malate. A ciò si aggiunge un effetto secondario che peggiora marcatamente lo stato di salute e che può condurre a un deterioramento irreversibile, dal quale molte persone non riescono più a uscire. Sulla base di una revisione della letteratura scientifica più recente, riesamineremo e selezioneremo i migliori interventi motori e cognitivi sviluppati congiuntamente nell'ambito del progetto MEMORI.net, integrandoli con interventi nutrizionali in grado di ridurre le alterazioni fisiopatologiche dovute all'inattività fisica nella prima fase della riabilitazione funzionale dopo l'ictus. Per valutare l'efficacia della riabilitazione funzionale, definiremo il protocollo di uno studio clinico sull'inattività fisica in partecipanti appartenenti alla stessa fascia d'età in cui l'ictus si manifesta più frequentemente. Definiremo inoltre tutte le procedure di valutazione dello stato di salute da eseguire prima e dopo lo studio sull'inattività fisica.

Breve descrizione, motivazione e background scientifico:

Sebbene l'inattività fisica (IF) sia salita al secondo posto tra i fattori di rischio di mortalità complessiva (rapporto OMS 2019), dal settimo che occupava nel 2006, va sottolineato che essa rappresenta il fattore di salute più facilmente modificabile in tutte le fasce d'età. Gli effetti dell'IF (un killer silenzioso) possono rimanere non rilevati per anni o decenni, prima che da essi si sviluppi una malattia prevenibile. L'IF è associata all'insorgenza precoce di malattie croniche non trasmissibili, che conducono a problemi di salute e alla mortalità per tutte le cause. Inoltre, **l'IF è un fattore indipendente della nostra salute** in quanto mostra una debole correlazione con l'attività fisica da moderata a vigorosa (MVPA) **e rappresenta la maggiore minaccia per la nostra salute**. Stiamo assistendo a periodi di IF sempre più lunghi, sia nelle popolazioni attive sia in quelle inattive. Uno studio recente condotto su giovani atleti universitari e sui loro coetanei inattivi ha evidenziato valori giornalieri elevati, senza differenze nei valori medi del tempo trascorso seduti (11.0 ± 3.0 ore) tra i due gruppi ^[1]. Gli atleti possono essere al tempo stesso molto attivi e molto sedentari, per cui occorre considerare l'effetto netto di entrambi i fattori sulla loro salute. È importante sottolineare che il tempo trascorso seduti è oltre 20 volte più rappresentato rispetto alla MVPA, che negli adulti ammonta a soli 22 ± 15 minuti al giorno (rapporto OMS 2019). Gli interventi potrebbero infatti produrre risultati migliori se mirassero a ridurre l'IF e il tempo sedentario, anziché limitarsi a promuovere la MVPA.

Numerose pubblicazioni scientifiche considerano l'IF una pandemia, a sostegno della pubblicazione del Piano d'azione globale dell'OMS sull'attività fisica 2018–2030. Tale documento si propone di ottenere una riduzione relativa dell'IF del 10% entro il 2025 e del 15% entro il 2030, contribuendo così ad allungare l'aspettativa di vita e a migliorare la qualità della

contromisure basate sull'allenamento e la riabilitazione, nel contrastare l'atrofia e la disfunzione muscolare causate da inattività e disuso ^[19,20].

- **Il disuso del muscolo scheletrico si accompagna a un declino morfologico e funzionale** ^[21–25]. La riduzione della massa muscolare è molto rapida: circa il 2% dell'area di sezione trasversa (CSA) del quadricipite va perduto in soli 2 giorni di immobilizzazione con tutore di ginocchio ^[26] oppure dopo 3 giorni di immersione a secco (dry immersion) ^[27], e circa il 5% dopo 14 giorni di sospensione unilaterale dell'arto inferiore ^[21]. È importante rilevare che la perdita di forza muscolare associata è considerevolmente maggiore di quella delle dimensioni muscolari: circa il 9% dopo 3 giorni di immersione a secco ^[27] o 5 giorni di immobilizzazione ^[28] e il 15-27% dopo 14 o più giorni di scarico ^[21,23,29–31]. A sua volta, tale perdita di forza muscolare si associa a una perdita ancora maggiore di potenza meccanica ^[32–34], che è il parametro più rilevante per l'esecuzione efficace della maggior parte delle attività motorie della vita quotidiana. A livello di singola fibra, la riduzione della forza specifica (Po), che deriva da un decremento maggiore della forza isometrica, Fo, rispetto alla CSA) è un determinante principale della perdita di potenza di picco, mentre la massima velocità di accorciamento sembra meno influenzata dal disuso ^[24,35,36].
- Poiché **il disuso di breve durata (7-15 giorni) è una condizione comune sia nei giovani sia negli anziani**, quando sono allettati in seguito a un trauma ^[37] o a un intervento chirurgico ^[38], e nei pazienti critici ^[39], lo studio dei possibili determinanti della riduzione sproporzionata della forza muscolare rispetto a quella delle dimensioni muscolari riveste notevole rilevanza. Inoltre, pochi studi hanno affrontato le interazioni tra muscolo e controllo nervoso, attraverso i circuiti sensomotori e la NMJ, nel determinare intolleranza all'esercizio e compromissione metabolica sistemica, né i meccanismi sottostanti. L'IF riguarda tutte le età. Poco si conosce circa l'impatto dell'IF negli adulti più anziani (55-65 anni). La recente epidemia di COVID-19 ha indotto IF in milioni di persone di ogni età in tutto il mondo ^[17,18,40] e ne ha evidenziato le conseguenze dannose.
- Manca tuttavia una **spiegazione chiara ed esaustiva del motivo per cui la forza contrattile diminuisce più rapidamente della massa muscolare**. Risposte soltanto parziali sono state ottenute dall'analisi del processo di generazione della forza a livello miofibrillare ^[25,41–44] e dalla trasmissione della forza attraverso la matrice extracellulare e i tendini ^[21,45,46] fino alle ossa. Un possibile indizio è emerso da uno studio recente ^[27] che ha mostrato come l'immersione a secco, **una forma estrema di disuso, sia in grado di indurre in soli 3 giorni una progressione iniziale e parziale della denervazione delle fibre**. Questo risultato è in linea con osservazioni precedenti sull'impatto di 14 giorni di BR in un gruppo di uomini e donne nella sesta decade di vita, quindi predisposti ad alterazioni della connessione neuromuscolare legate all'età ^[47]. Sulla base di queste considerazioni, approfondiremo lo studio della stabilità della NMJ, che rappresenta la connessione tra muscoli e nervi ed è legata all'innervazione delle miofibre. Estenderemo inoltre l'analisi a monte, alla capacità volontaria di attivazione muscolare da parte del sistema nervoso centrale, e a valle, ai segnali intracellulari del calcio che collegano il potenziale d'azione generato a livello della NMJ ai motori miofibrillari.

Sebbene l'IF interessi la maggior parte degli apparati, il deterioramento della massa e della forza muscolare, del controllo neuromuscolare e del metabolismo energetico ne rappresenta il fenomeno principale ^[54]. L'IF provoca inoltre una serie di risposte che coinvolgono il sistema nervoso, il metabolismo e il sistema cardiovascolare. Diversi aspetti restano ancora incompletamente compresi, soprattutto nell'uomo:

- i meccanismi della perdita sproporzionata di forza rispetto alla massa muscolare ^[55,56].
- il ruolo relativo del controllo somatomotorio, della NMJ, del muscolo e del metabolismo energetico nella compromissione del movimento ^[54,57,58] e del lavoro muscolare ^[59].
- il dialogo tra nervo e muscolo nell'instabilità della NMJ ^[60].
- i meccanismi responsabili della compromissione del metabolismo ossidativo e la relazione con lo sviluppo di alterazioni neuromuscolari ^[61] e di insulino-resistenza ^[62].

Sebbene obiettivi e task siano formulati con riferimento alla sola fase di disuso (finalità principale del progetto), studieremo con pari attenzione anche il recupero successivo. Per affrontare tali questioni, perseguiremo 3 obiettivi specifici attraverso 10 task interconnessi, in adulti giovani e di mezza età, nel modello di IF rappresentato dal BR:

Progetteremo pertanto un **BR orizzontale di 21 giorni (con 21 giorni di recupero) in 10 uomini giovani e sani** (18-30 anni) e un **BR orizzontale di 10 giorni (con 21 giorni di recupero) in 10 uomini anziani e sani** (65-75 anni), al fine di approfondire i determinanti precoci della marcata perdita di volume, forza e potenza muscolare legata allo scarico. Studieremo di conseguenza la morfologia, l'integrità e la funzione del sistema neuromuscolare prima, durante e al termine del periodo di BR. Verificheremo le ipotesi secondo cui: (i) una compromissione precoce della trasmissione neuromuscolare, verosimilmente legata all'instabilità della NMJ, potrebbe svilupparsi poco dopo l'esposizione allo scarico; (ii) tale compromissione potrebbe accompagnarsi ad alterazioni della segnalazione del calcio all'interno della fibra; (iii) tali modificazioni potrebbero associarsi a una riduzione della capacità di attivazione; e (iv) esistono differenze nel declino e nella capacità di riallenamento tra adulti giovani e anziani.

Obiettivi e risultati attesi:

Task 1 volume, architettura, contrattilità, forza e potenza muscolare

Valuteremo: (i) la variazione del volume muscolare corporeo totale e del quadricipite; (ii) la variazione dell'architettura muscolare in 4 muscoli scheletrici dell'arto inferiore; (iii) le proprietà contrattili meccaniche (twitch) in 4 muscoli scheletrici dell'arto inferiore; (iv) le variazioni della forza e della potenza volontaria del quadricipite.

Risultati attesi. Ci attendiamo un deterioramento fino al 50% maggiore negli anziani rispetto ai giovani, a parità di durata dell'esposizione al BR (10 giorni). Gli anziani mostreranno inoltre una minore capacità di riallenamento rispetto ai giovani.

Task 2 dimensioni, forza, tensione e velocità della fibra muscolare, matrice extracellulare con citoscheletro e composizione in MHC

Valuteremo: (i) l'area di sezione trasversale della fibra muscolare; (ii) velocità, forza e tensione specifica; (iii) la dinamica del calcio sulla base della risposta alla caffeina; (iv) la curva forza-pCa; (v) la distribuzione delle isoforme della catena pesante della miosina; (vi) i componenti della matrice extracellulare e del citoscheletro.

Risultati attesi. Come nel Task 1, ci attendiamo risultati analoghi anche a livello di fibra muscolare, ossia un impatto maggiore del BR sulla funzione della fibra muscolare negli anziani. Non prevediamo variazioni nella proporzione delle catene pesanti della miosina dopo l'esposizione a BR e SR, mentre ci attendiamo variazioni nella composizione della matrice extracellulare e del citoscheletro.

Task 3 Eccitabilità sopraspinale e spinale

Procederemo a: (i) utilizzare la tecnica del doppietto twitch interpolato ^[64] per valutare l'attivazione centrale, stima dell'integrità del controllo somatomotorio dalla corteccia motoria agli α -motoneuroni; (ii) studiare il gradiente di sviluppo della forza e il tempo di rilasciamento mediante contrazioni twitch evocate elettricamente, al fine di stimare le alterazioni della contrattilità muscolare, indice indiretto dell'efficienza dell'accoppiamento eccitazione-contrazione (E-C); (iii) studiare il riflesso H, l'onda V e l'onda M ^[65] per valutare i cambiamenti plastici nei circuiti neuronali spinali responsabili del controllo pre/post-sinaptico a livello midollare ^[66].

Task 4 Pattern di attivazione neuromuscolare e mappe spinali

Registreremo l'EMG di superficie multimuscolare da 16 muscoli dell'arto inferiore, calcoleremo i pattern temporali di attivazione muscolare, le sinergie muscolari e le mappe spinali spazio-temporali, per descrivere l'output degli alfa-motoneuroni ^[67].

Task 5 Comportamento delle unità motorie e funzione della NMJ

Studieremo il decorso temporale dell'adattamento alla ridotta attività di numerose unità motorie (MU) individuali (frequenza di scarica (MUDR), soglie di reclutamento (RT) e velocità di conduzione (MUCV)), impiegando i più recenti progressi tecnici nelle registrazioni EMG (ad es. EMG di superficie ad alta densità (HD-EMG)) e nella loro decomposizione ^[68]. Gli adattamenti della funzione della NMJ saranno stimati mediante tecniche elettromiografiche quantitative ad ago, che riflettono le proprietà dei potenziali delle MU (tecnica MUNE), per valutare i parametri di jitter e jiggle, indici riconosciuti dell'efficienza di trasmissione della NMJ ^[69].

Risultati attesi. È atteso che il disuso corrisponda a un aumento delle soglie di reclutamento delle MU e che ciò si associ a una riduzione sia della MUDR sia della MUCV. In associazione con il task 5, emergerà un quadro complessivo degli adattamenti del controllo somatomotorio al disuso.

Obiettivo 2: definire le alterazioni della NMJ e il loro ruolo funzionale

Sulla base di risultati molto recenti sulla NMJ nel topo, **ipotizziamo** che adattamenti molto precoci possano condurre, su scale temporali diverse, a: instabilità della NMJ, alterazione del controllo neuromuscolare, insulino-resistenza e deperimento muscolare.

Task 6 stabilire la presenza e l'entità delle alterazioni della NMJ

Valuteremo la stabilità della NMJ analizzando: (a) l'espressione delle subunità dell'AChR ^[70]; (b) i componenti di segnalazione della via agrina/MuSK/Lrp4; (c) il contenuto di Homer 2 (un attore molecolare nella traduzione dell'input sinaptico alle fibre muscolari scheletriche ^[71] e nel controllo del trofismo del muscolo scheletrico ^[72]); (d) l'espressione dei miRNA muscolo-specifici influenzati dall'inattività che incidono sulla stabilità della NMJ ^[73]; (e) il frammento C-terminale dell'agrina (CAF) nei campioni di siero, biomarcatore di danno della NMJ ^[74]; (f) la creatinina sierica come biomarcatore di denervazione e atrofia muscolare ^[75].

Risultati attesi: adattamenti complessi a più livelli dell'integrità della NMJ, quali alterata espressione e clustering degli AChR, minore espressione di Lrp4 e MuSK nel muscolo, unitamente a livelli ematici aumentati di CAF, indicativi di danno della NMJ.

Task 7 definire la relazione tra le alterazioni della NMJ e l'integrità della struttura e della funzione muscolare

La presenza di denervazione sarà studiata attraverso il livello di espressione di geni specifici associati all'inattività e alla denervazione della NMJ, nonché attraverso la comparsa di fibre NCAM-positive.

La presenza di alterazioni del muscolo scheletrico sarà determinata in termini di: (1) dimensioni delle miofibre;

(2) vie intracellulari che regolano l'equilibrio tra sintesi e degradazione proteica; (3) adattamento mitocondriale molecolare e funzionale; (4) stato redox e stress ossidativo; (5) livelli di neurotrofine nel muscolo.

Risultati attesi: ci attendiamo di verificare l'ipotesi di lavoro sul ruolo dell'asse AMPK/PGC1alfa nel collegare gli adattamenti muscolari, metabolici e somatomotori.

Obiettivo 3: definire la compromissione metabolica: metabolismo energetico e glucidico

Il metabolismo ossidativo limita la tolleranza all'esercizio e la capacità di lavoro nella vita quotidiana, e la sua compromissione rappresenta un importante fattore di rischio per le malattie croniche. Alla compromissione del metabolismo ossidativo conseguente all'inattività contribuiscono fattori sia centrali (cardiovascolari) sia periferici (flusso ematico periferico, funzione endoteliale, accoppiamento intramuscolare tra apporto di O₂ e consumo di O₂, diffusione periferica di O₂, respirazione mitocondriale). Tra i fattori periferici, la disfunzione mitocondriale e lo squilibrio redox possono contribuire a (i) sviluppo di alterazioni maladattative a carico dei motoneuroni, della NMJ e delle fibre muscolari ^[76] e (ii) insulino-resistenza ^[62].

Task 8 definire la compromissione metabolica a livello muscolare e sistemico

Durante l'esercizio al cicloergometro a diverse intensità, determineremo: (i) il picco di VO_2 ; la gittata cardiaca di picco; la frazione di estrazione di picco di O_2 da parte del muscolo scheletrico^[77]; la funzione respiratoria e la funzione dei muscoli respiratori (pressioni inspiratorie ed espiratorie massime) a riposo e dopo esercizio massimale, le "soglie"^[77], la riduzione del carico di lavoro a una frequenza cardiaca lievemente superiore al GET^[78]; (ii) le funzioni vascolari periferiche ed endoteliali^[79]; (iii) l'accoppiamento intramuscolare tra apporto di O_2 e consumo di O_2 ^[80]; (iv) la respirazione mitocondriale mediante l'analisi della cinetica di recupero del VO_2 muscolare^[81].

Sui campioni muscolari studieremo: (v) la respirazione mitocondriale mediante respirometria ad alta risoluzione su fibre muscolari permeabilizzate^[82] e la sensibilità mitocondriale all'[ADP] submassimale^[83], (vi) stime della massa mitocondriale; (vii) la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS)^[83]; (viii) la suscettibilità alla transizione di permeabilità nella membrana mitocondriale interna^[84]; (ix) lo stato di assemblaggio dell'ATP sintasi mitocondriale (complesso V) e la sua interazione con la proteina di matrice ciclofilina D, regolatore principale della transizione di permeabilità^[84].

Risultati attesi: caratterizzazione dei soggetti in termini di capacità e tolleranza all'esercizio; confronto tra le compromissioni centrali vs. periferiche del metabolismo ossidativo e tra le compromissioni legate all'apporto di O_2 vs. quelle legate alla disfunzione mitocondriale; entità, decorsi temporali e comportamenti individuali dei marcatori di disfunzione mitocondriale, e relazione con le alterazioni della NMJ e con lo sviluppo di insulino-resistenza. Formazione di complessi vestigiali di ATP sintasi potenzialmente responsabili di un'alterata respirazione e/o di una maggiore propensione dell'ATP sintasi a passare da enzima conservatore di energia a enzima dissipatore di energia, con formazione del poro di transizione di permeabilità, e possibile ruolo dell'asse AMPK/PGC1alfa nel contrastare tali alterazioni.

Task 9 studiare il ruolo dell'insulino-resistenza e delle specie reattive dell'ossigeno (ROS)

Per valutare il decorso temporale dello stato redox e dell'insulino-resistenza, determineremo la concentrazione eritrocitaria dell'intero ciclo gamma-glutamilico [Qi], il rapporto GSH/GSSG^[85] e l'espressione della glutamil-cisteina sintetasi^[86]. L'insulino-resistenza sarà valutata mediante clamp euglicemico iperinsulinemico e indice HOMA^[87]. Esploreremo inoltre i meccanismi a valle della modificazione dell'espressione e dell'attività delle metalloproteasi di matrice e dei loro inibitori^[88].

Risultati attesi: Determinazione dell'entità dello stress ossidativo, dell'insulino-resistenza e dei livelli di MMP/TIMP, e correlazione di questi risultati con le variazioni della massa muscolare, della performance e con altre modificazioni metaboliche.

Numerosità campionaria stimata dei partecipanti allo studio: Lo studio sarà condotto su 30 partecipanti:

- GIOVANI: 10 uomini giovani, di età compresa tra 18 e 30 anni;

- ANZIANI: 20 uomini anziani, di età compresa tra 65 e 75 anni.

Stima della potenza statistica: Abbiamo effettuato il calcolo e deciso di arruolare 10 partecipanti in entrambi gli studi di BR. L'analisi di potenza è stata condotta sulla parte più rilevante degli studi – il disuso – sulla base di alcune assunzioni: $\alpha \leq 0.05$; test a 1 coda, $\beta = 0.3$; $P = 0.7$, per gli outcome principali di forza muscolare, dimensioni muscolari e potenza anaerobica:

Outcome	Pre	Post	N	Riferimenti
BR di 10 giorni negli anziani				
Volume del quadricipite / cm^3	1667±234	1525±211	13	[51]
Forza del quadricipite / N	546±110	475±109	11	[51]
Potenza anaerobica / W/kg	35±5.7	30±5.7	10	[51]
Potenza aerobica / $\text{mlO}_2/\text{kg}/\text{min}$	27±4.9	22±3.4	5	[51]
BR di 21 giorni nei giovani				
Potenza aerobica / $\text{mlO}_2/\text{kg}/\text{min}$	38±6	31±5	4	[99]
Volume degli estensori del ginocchio / cm^3	270±30	247±31	10	[100]
Forza del quadricipite / kg	48±8	40±8	6	[101]

Procedure: Dopo l'approvazione del comitato etico, un BR di 21 giorni in 10 uomini giovani (18-30 anni) e di 10 giorni di BR in 10 adulti anziani (55-65 anni), entrambi con 21 giorni di recupero, saranno organizzati in ambito ospedaliero con supervisione medica 24 ore su 24 (come nei nostri 5 studi precedenti, di durata compresa tra 10 e 35 giorni di BR/recupero). Recluteremo partecipanti sani (+2 di riserva e per il test pilota) applicando i seguenti criteri di esclusione (fumo, consumo abituale di alcol, impianti ferromagnetici; anamnesi di trombosi venosa profonda con D-dimero $>500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; patologie acute o croniche scheletriche, neuromuscolari, metaboliche e cardiovascolari; embolia polmonare; $21 >$ indice di massa corporea $>25 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$, atleti, <90 minuti giornalieri di MVPA). Tutti i partecipanti saranno sottoposti a valutazione kinesiologica (VO_2max , test di potenza degli arti inferiori) e a visita

medica (ECG a riposo e da sforzo, pressione arteriosa, colloquio anamnestico). Dopo i test pilota su 2 partecipanti di riserva, i partecipanti entreranno nello studio a coppie, 2 al giorno, con 2 giorni di adattamento alle attività e alla dieta ospedaliera, seguiti da 2 giorni di valutazione basale (BDC), 10/21 giorni di BR e 2 giorni di riambulazione prima della dimissione (BR10/BR21). Successivamente seguiranno un protocollo di recupero (si veda oltre) e torneranno per la valutazione al 21° giorno di recupero (REC21). Tutti i test saranno eseguiti secondo il medesimo calendario (BDC, BR10, BR21 e REC21). Durante il BR i partecipanti trascorreranno 10/21 giorni in posizione orizzontale (sono consentiti i movimenti sul piano orizzontale), con 1 cuscino sotto la testa. Non sarà consentito alcun ulteriore sollevamento o abbassamento rispetto alla posizione verticale, al fine di minimizzare lo stress cardiovascolare. Tutte le attività quotidiane e i test durante il BR saranno eseguiti in tale posizione. Un infermiere e alcuni studenti collaboreranno alla distribuzione dei pasti, all'igiene personale, al trasporto del letto e alla sorveglianza. Il medico effettuerà il monitoraggio quotidiano dello stato di salute generale. Il fisioterapista eseguirà stretching passivo ogni due giorni di BR. La dieta durante il BR sarà energeticamente neutra, pari a 1.2 volte il metabolismo a riposo ^[9]. Il contenuto in macronutrienti sarà fissato al 60% di carboidrati, 25% di grassi e 15% di proteine. Il periodo di sonno sarà compreso tra le 22:00 e le 07:00.

Interventi:

Venti partecipanti anziani saranno suddivisi in modo casuale in due gruppi da 10. Soltanto il gruppo sperimentale riceverà 3 interventi:

- a) programma supervisionato di allenamento preparatorio di 8 settimane, con 3 sedute settimanali di 60 minuti, finalizzato al rafforzamento della muscolatura degli arti inferiori e al condizionamento cardiovascolare.
- b) durante il periodo di allettamento: 45 minuti giornalieri di esercizio cognitivo mediante sistemi di realtà virtuale (immaginazione motoria), mirati al controllo motorio degli estensori del ginocchio.
- c) durante il periodo di allettamento: supplementazione proteica aggiuntiva pari a 1,6 g/kg/die con aminoacidi (11.4 g/die di leucina libera, 1.33 mmol/kg/die di glicina, 0.81 mmol/kg/die di N-acetil-cisteina).

Metodi di valutazione

Tutte le valutazioni saranno eseguite in 4 momenti temporali (BDC, BR10, BR21 e REC21):

- L'attività fisica sarà misurata mediante accelerometri indossati al fianco.
- La composizione corporea (massa grassa) sarà misurata mediante antropometria standard e DXA total body.

- La massa muscolare degli arti inferiori sarà misurata mediante scansione RM in continuo. I set di dati turbo spin-echo pesati in T1 di entrambe le cosce saranno acquisiti in orientamento assiale (trasversale). I parametri di acquisizione saranno i seguenti. Sequenza: vibe, TR/TE: 7.8/3.69 ms, angolo di flip: 20°, campo di vista: 450 × 337.5 mm, dimensione del voxel: 0.9×0.9×6 mm, nessun gap tra le sezioni, spessore di strato: 6 mm, larghezza di banda in lettura 320 Hz/pixel (278 kHz). Nelle immagini corrispondenti, i contorni del quadricipite femorale (QF) e del vasto laterale (VL) saranno digitalizzati in ordine randomizzato utilizzando il software di analisi di immagini DICOM OsiriX (versione 11). All'interno della scansione, i contorni della CSA di QF e VL saranno tracciati ogni due immagini assiali; i volumi di VL e QF saranno derivati sommando una serie di tronchi di cono compresi tra due immagini assiali (~20–25 immagini valutate per scansione).
- L'architettura di VL, gastrocnemio mediale, tibiale anteriore e bicipite femorale sarà misurata mediante ecografia lineare con campo di vista esteso (EFOV), anche a BR1, BR2, BR5, BR10 e REC2. La CSA del QF sarà misurata mediante imaging ecografico (Mylab70). La sonda ecografica sarà fatta scorrere lungo la superficie cutanea e lungo il piano di interesse (nel nostro caso, il piano trasversale). Durante lo scorrimento della sonda, i fotogrammi successivi saranno registrati e ricomposti dall'algoritmo, così da ottenere un'immagine panoramica. Saranno individuate diverse regioni di interesse al 30%, 50% (CSA50) e 70% della lunghezza del femore (misurata dal grande trocantere al punto medio-rotuleo) e contrassegnate sulla cute.
- Le proprietà contrattili saranno valutate parallelamente all'architettura, negli stessi muscoli, mediante TMG. In sintesi, in ciascun muscolo sarà rilevata la risposta meccanica massima a un impulso elettrico di 1 millisecondo, utilizzando un sensore di spostamento per misurare il tempo di contrazione, al fine di stimare la composizione in catene pesanti della miosina di tipo I^[103] e l'insorgenza precoce dell'atrofia muscolare^[4].
- Le contrazioni volontarie massimali (MVC) del QF, il gradiente di sviluppo della forza (RFD) e la capacità di attivazione saranno misurati in condizioni isometriche, con il ginocchio flesso a 30 gradi e l'anca fissata a 90 gradi di flessione, utilizzando un dinamometro per ginocchio realizzato su misura e dotato di cella di carico (RS 206–0290). Prima dei test saranno garantiti un riscaldamento e una fase di familiarizzazione. Il segnale della cella di carico sarà acquisito (BIOPAC MP100, Biopac Inc.) a 2 kHz e analizzato con il software AcqKnowledge. La contrazione con il valore di forza più elevato sarà considerata come MVC. La MVC degli estensori del ginocchio sarà normalizzata per la CSA del QF, così da ottenere la forza specifica del QF. Il RFD sarà misurato come il tempo necessario a raggiungere il 63% della MVC. La capacità di attivazione sarà valutata mediante la tecnica del doppio twitch interpolato.
- La potenza e la funzione muscolare saranno valutate mediante una serie di 3 salti con contromovimento (counter-movement jump) eseguiti separatamente. I test saranno

effettuati su pedana di forza Kistler, selezionando il salto migliore in base alla potenza di picco. Le braccia saranno mantenute fisse sui fianchi. Saranno registrate la potenza e la forza relative di picco (ossia normalizzate per la massa corporea), nonché l'altezza massima del salto.

- I campioni biotipici del VL (circa 150 mg) saranno prelevati mediante biopsia percutanea dal VL destro all'inizio e alla fine dell'allettamento, nonché a BR5 dal VL sinistro, da parte di un chirurgo esperto. Il prelievo biotipico sarà eseguito previa anestesia della cute, del tessuto adiposo sottocutaneo e della fascia muscolare con 2 ml di lidocaina (2%). Sarà praticata una piccola incisione per attraversare cute e fascia, e il campione di tessuto sarà prelevato con un conchotomo di Weil–Blakesley. Dopo la biopsia, i campioni muscolari saranno suddivisi in tre parti. La prima sarà utilizzata per la dissezione di singole fibre muscolari, al fine di determinare CSA, forza (Fo), tensione specifica (Po), responsività alla caffeina e curva forza-pCa. La seconda parte della biopsia sarà congelata in isopentano, raffreddato in azoto liquido, e conservata a -80°C per la successiva analisi immunoistochimica; la terza parte sarà congelata in azoto liquido e conservata a -80°C per l'analisi proteica e dell'mRNA.
- Gli esperimenti su singola fibra saranno eseguiti dopo permeabilizzazione (skinning), attivazione, caricamento e lavaggio delle fibre. I fasci di fibre muscolari, fissati distesi su piccoli supporti in sylgard, saranno conservati a -20°C in soluzione di skinning miscelata con glicerolo al 50%. Le singole fibre saranno dissezionate manualmente in segmenti lunghi 1–2 mm e a entrambe le estremità saranno applicate leggere clip in alluminio. I segmenti saranno quindi trasferiti nel setup sperimentale, posizionati sul tavolino di un microscopio invertito Zeiss Axiovert 25 (Zeiss, Milano, Italia) e montati tra il trasduttore di forza (AME-801 SensorOne, Sausalito) e il tiratore elettromagnetico (SI, Heidelberg), dotato di trasduttore di spostamento. I segmenti saranno montati in soluzione rilassante a lunghezza di riposo e quindi stirati di $\sim 20\%$ per raggiungere una lunghezza sarcomerica prossima a $2.8\ \mu\text{m}$, ossia al limite superiore del plateau della relazione tensione–lunghezza. La lunghezza sarcomerica e 3 diametri sul piano orizzontale, equidistanti lungo il segmento, saranno misurati sulle immagini acquisite ad alto ingrandimento (320x) con una fotocamera digitale (Optikam B5, Optika); la CSA sarà calcolata assumendo una forma circolare e mediata. Una volta montata nel setup, ciascuna fibra sarà sottoposta a un protocollo comprendente rilasci di calcio indotti dalla caffeina e attivazioni massimali dopo una manovra di accorciamento–riallungamento. Registreremo la forza isometrica (Fo) e la velocità (vo), nonché la costante di velocità KTR di risviluppo della tensione. Il rilascio di calcio indotto dalla caffeina consentirà di testare la funzione del reticolo sarcoplasmatico. A tal fine, le fibre saranno immerse per 5 minuti nella specifica soluzione di caricamento con caffeina da 4 mM a 20 mM, così da indurre un rilascio massimale.
- La molecola di adesione delle cellule neurali (NCAM) sarà rilevata mediante immunoistochimica sui campioni muscolari. I campioni congelati saranno sezionati in fettine di $8\ \mu\text{m}$ di spessore. Il rilevamento e la quantificazione delle miofibre denervate sono stati effettuati mediante immunomarcatura per NCAM. In sintesi, le criosezioni

saranno fissate in metanolo freddo per 10 minuti a -20°C , lavate, marcate con anticorpo diretto contro NCAM e risciacquate. Le fibre NCAM-positive saranno contate sulle immagini acquisite utilizzando il software Image ed espresse come numero di miofibre positive sul numero totale di miofibre rilevate nell'area biotica mediante colorazione per laminina.

- I campioni di sangue saranno prelevati dalla vena mediana cubitale di ciascun partecipante alle ore 07:00 a BR0, BR5 e REC21. Dopo il prelievo, i campioni saranno centrifugati (CENTRIC 400, Tehtnica Železniki) a 2480 g per 10 minuti, per separare siero e plasma. Successivamente saranno preparate aliquote da 500 μl sia di siero sia di plasma, raffreddate e conservate a -80°C fino all'analisi.
- Il frammento C-terminale dell'agrina sierica (CAF) sarà determinato mediante kit di saggio immunoenzimatico (ELISA) (Human Agrin SimpleStep ELISA, Ab216945), secondo le istruzioni del produttore. Le concentrazioni di CAF ottenute saranno determinate mediante lettore ELISA per micropiastre (Tecan, Infinite M200). Per valutare le concentrazioni sieriche di CAF sarà preparata una curva standard (caricata con concentrazioni note e crescenti di CAF), letta a 450 nm. Le concentrazioni sieriche di CAF saranno interpolate dalla curva standard del CAF e corrette per la diluizione del campione.

Riferimenti bibliografici:

- [1] E. Aries, D. McCarthy, P. Salovey, M. R. Banaji, *Research in Higher Education* **2004**, 45, 577.
- [2] U. Marusic, M. Narici, B. Šimunič, R. Pišot, R. Ritzmann, *Journal of Applied Physiology* **2021**, japplphysiol.00363.2020.
- [3] R. Pišot, M. Narici, B. Šimunič, M. de Boer, O. Seynnes, M. Jurdana, G. Biolo, M. IB., *European journal of applied physiology* **2008**, 104, 2.
- [4] B. Šimunič, K. Koren, J. Rittweger, S. Lazzer, C. Reggiani, E. Rejc, R. Pišot, M. Narici, H. Degens, *Journal of Applied Physiology* **2019**, DOI 10.1152/japplphysiol.00880.2018.
- [5] M. D. de Boer, O. R. Seynnes, P. E. di Prampero, R. Pišot, I. B. Mekjavič, G. Biolo, M. v. Narici, *European Journal of Applied Physiology* **2008**, 104, 401.
- [6] E. Rejc, P. E. di Prampero, S. Lazzer, B. Grassi, B. Šimunič, R. Pišot, G. Antonutto, M. Narici, *European Journal of Applied Physiology* **2015**, 115, 429.
- [7] N. N. Konda, R. S. Karri, A. Winnard, M. Nasser, S. Evetts, E. Boudreau, N. Caplan, D. Gradwell, R. M. Velho, *npj Microgravity* **2019**, 5, 12.
- [8] J. Rittweger, B. Šimunič, G. Bilancio, N. Gaspare De Santo, M. Cirillo, G. Biolo, R. Pišot, O. Eiken, I. B. Mekjavič, M. Narici, *Bone* **2009**, 44, DOI 10.1016/j.bone.2009.01.001.
- [9] G. Biolo, F. Agostini, B. Šimunič, M. Sturma, L. Torelli, J. C. Preiser, G. Deby-Dupont, P. Magni, F. Strollo, P. di Prampero, G. Guarnieri, I. B. Mekjavič, R. Pišot, M. v. Narici, *American Journal of Clinical Nutrition* **2008**, 88, 950.
- [10] G. Biolo, R. Pišot, S. Mazzucco, F. G. di Girolamo, R. Situlin, S. Lazzer, B. Grassi, C. Reggiani, A. Passaro, J. Rittweger, M. Gasparini, B. Šimunič, M. Narici, *Clinical Nutrition* **2017**, 36, 1420.
- [11] S. Porcelli, M. Marzorati, F. Lanfranconi, P. Vago, R. Pišot, B. Grassi, *Journal of Applied Physiology* **2010**, 109, 101.
- [12] D. Salvadeo, S. Lazzer, M. Marzorati, S. Porcelli, E. Rejc, B. Šimunič, R. Pišot, P. E. di Prampero, B. Grassi, *Journal of Applied Physiology* **2011**, 111, DOI 10.1152/japplphysiol.01380.2010.
- [13] U. Marusič, R. Pišot, V. Kavčič, *Psihološka obzorja / Horizons of Psychology* **2021**, 55.
- [14] U. Marusic, S. Grosprêtre, *European Journal of Sport Science* **2018**, 18, 639.
- [15] M. L. Alosco, M. B. Spitznagel, R. Cohen, N. Raz, L. H. Sweet, R. Josephson, J. Hughes, J. Rosneck, J. Gunstad, *Journal of the Neurological Sciences* **2014**, 339, 169.
- [16] D. H. J. Thijssen, D. J. Green, M. T. E. Hopman, *Journal of Applied Physiology* **2011**, 111, 1836.
- [17] A. Ammar, M. Brach, K. Trabelsi, H. Chtourou, O. Boukhris, L. Masmoudi, B. Bouaziz, E. Bentlage, D. How, M. Ahmed, P. Müller, N. Müller, A. Aloui, O. Hammouda, L. Paineiras-Domingos, A. Braakman-Jansen, C. Wrede, S. Bastoni, C. Pernambuco, L. Mataruna, M. Taheri, K. Irandoust, A. Khacharem, N. Bragazzi, K. Chamari, J. Glenn, N. Bott, F. Gargouri, L. Chaari, H. Batatia, G. Ali, O. Abdelkarim, M. Jarraya, K. el Abed, N. Souissi, L. van Gemert-Pijnen, B. Riemann, L. Riemann, W. Moalla, J. Gómez-Raja, M. Epstein, R. Sanderman, S. Schulz, A. Jerg, R. Al-Horani, T. Mansi, M. Jmail, F. Barbosa, F. Ferreira-Santos, B. Šimunič, R. Pišot, A. Gaggioli, S. Bailey, J. Steinacker, T. Driss, A. Hoekelmann, *Nutrients* **2020**, 12, 1583.
- [18] M. Narici, G. de Vito, M. Franchi, A. Paoli, T. Moro, G. Marcolin, B. Grassi, G. Baldassarre, L. Zuccarelli, G. Biolo, F. G. di Girolamo, N. Fiotti, F. Dela, P. Greenhaff, C. Maganaris, *European Journal of Sport Science* **2021**, 21, 614.
- [19] P. A. Tesch, T. R. Lundberg, R. Fernandez-Gonzalo, *Journal of Applied Physiology* **2016**, 120, 1207.
- [20] S. Y. Oikawa, T. M. Holloway, S. M. Phillips, *Frontiers in Nutrition* **2019**, 6, DOI 10.3389/fnut.2019.00075.
- [21] M. D. de Boer, C. N. Maganaris, O. R. Seynnes, M. J. Rennie, M. V. Narici, *Journal of Physiology* **2007**, 583, 1079.
- [22] Y. Kawakami, H. Akima, K. Kubo, Y. Muraoka, H. Hasegawa, M. Kouzaki, M. Imai, Y. Suzuki, A. Gunji, H. Kanehisa, T. Fukunaga, *European Journal of Applied Physiology* **2001**, 84, 7.

- [23] H. E. Berg, L. Larsson, P. A. Tesch, *Journal of Applied Physiology* **1997**, 82, 182.
- [24] S. Trappe, T. Trappe, P. Gallagher, M. Harber, B. Alkner, P. Tesch, *Journal of Physiology* **2004**, 557, 501.
- [25] E. L. Campbell, O. R. Seynnes, R. Bottinelli, J. S. McPhee, P. J. Atherton, D. A. Jones, G. Butler-Browne, M. V. Narici, *Biogerontology* **2013**, 14, 247.
- [26] S. P. Kilroe, J. Fulford, S. R. Jackman, L. J. C. Van Loon, B. T. Wall, *Temporal Muscle-Specific Disuse Atrophy during One Week of Leg Immobilization*, **2020**.
- [27] R. Demangel, L. Treffel, G. Py, T. Brioché, A. F. Pagano, M. P. Bareille, A. Beck, L. Pessemesse, R. Candau, C. Gharib, A. Chopard, C. Millet, *Journal of Physiology* **2017**, 595, 4301.
- [28] B. T. Wall, M. L. Dirks, T. Snijders, J. M. G. Senden, J. Dolmans, L. J. C. Van Loon, *Acta Physiologica* **2014**, 210, 600.
- [29] M. L. Urso, P. M. Clarkson, T. B. Price, *European Journal of Applied Physiology* **2006**, 96, 564.
- [30] E. I. Glover, S. M. Phillips, B. R. Oates, J. E. Tang, M. A. Tarnopolsky, A. Selby, K. Smith, M. J. Rennie, *Journal of Physiology* **2008**, 586, 6049.
- [31] S. W. Jones, R. J. Hill, P. A. Krasney, B. O'Connor, N. Peirce, P. L. Greenhaff, *The FASEB Journal* **2004**, 18, 1025.
- [32] E. Rejc, M. Floreani, P. Taboga, A. Botter, L. Toniolo, L. Cancellara, M. Narici, B. Šimunič, R. Pišot, G. Biolo, A. Passaro, J. Rittweger, C. Reggiani, S. Lazzer, *Journal of Physiology* **2018**, 596, 647.
- [33] E. Rejc, P. E. di Prampero, S. Lazzer, B. Grassi, B. Simunic, R. Pisot, G. Antonutto, M. Narici, *European Journal of Applied Physiology* **2015**, 115, 429.
- [34] G. Ferretti, *International Journal of Sports Medicine, Supplement* **1997**, 18, 1995.
- [35] J. J. Widrick, K. M. Norenberg, J. G. Romatowski, C. A. Blaser, M. Karhanek, J. Sherwood, S. W. Trappe, T. A. Trappe, D. L. Costill, R. H. Fitts, *Force-Velocity-Power and Force-PCa Relationships of Human Soleus Fibers after 17 Days of Bed Rest*, **1998**.
- [36] R. H. Fitts, J. G. Romatowski, J. R. Peters, D. Paddon-Jones, R. R. Wolfe, A. A. Ferrando, *American Journal of Physiology - Cell Physiology* **2007**, 293, 313.
- [37] L. A. Costa, N. O. Foni, E. Antonioli, R. T. De Carvalho, I. D. Paiao, M. Lenza, M. Ferretti, *PLoS ONE* **2018**, 13, 1.
- [38] L. Pascal, S. Polazzi, V. Piriou, E. Cotte, J. Wegryn, M. J. Carty, F. Chollet, S. Sanchez, J.-C. Lifante, A. Duclos, *Annals of Surgery* **2019**, XX, 1.
- [39] Z. A. Puthucherry, J. Rawal, M. McPhail, B. Connolly, G. Ratnayake, P. Chan, N. S. Hopkinson, R. Padhke, T. Dew, P. S. Sidhu, C. Velloso, J. Seymour, C. C. Agley, A. Selby, M. Limb, L. M. Edwards, K. Smith, A. Rowlerson, M. J. Rennie, J. Moxham, S. D. R. Harridge, N. Hart, H. E. Montgomery, *JAMA - Journal of the American Medical Association* **2013**, 310, 1591.
- [40] P. M. Genin, C. Lambert, B. Larraz, B. Pereira, J.-F. Toussaint, J. S. Baker, A. Tremblay, D. Thivel, M. Duclos, *Journal of Physical Activity and Health* **2021**, 18, 296.
- [41] L. Larsson, X. Li, H. E. Berg, W. R. Frontera, *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* **1996**, 432, 320.
- [42] C. R. Lamboley, V. L. Wyckelsma, B. D. Perry, M. J. McKenna, G. D. Lamb, *Journal of Applied Physiology* **2016**, 121, 483.
- [43] L. G. Hvid, N. Ørtenblad, P. Aagaard, M. Kjaer, C. Suetta, *Journal of Physiology* **2011**, 589, 4745.
- [44] R. H. Fitts, D. R. Riley, J. J. Widrick, *Journal of Applied Physiology* **2000**, 89, 823.
- [45] N. D. Reeves, C. N. Maganaris, G. Ferretti, M. V. Narici, *Journal of Applied Physiology* **2005**, 98, 2278.
- [46] C. Couppé, C. Suetta, M. Kongsgaard, L. Justesen, L. G. Hvid, P. Aagaard, M. Kjaer, S. P. Magnusson, *Clinical Biomechanics* **2012**, 27, 949.
- [47] E. J. Arentson-Lantz, K. L. English, D. Paddon-Jones, C. S. Fry, *Journal of Applied Physiology* **2016**, 120, 965.
- [48] Olsen Rasmus H, Krogh-Madsen Rikke, Thomsen Carsten, Booth Frank W, Pedersen Bente K, *JAMA* **2008**, 299, 1261.
- [49] S. H. Knudsen, L. S. Hansen, M. Pedersen, T. Dejgaard, J. Hansen, G. van Hall, C. Thomsen, T. P. J. Solomon, B. K. Pedersen, R. Krogh-Madsen, *Journal of Applied Physiology* **2012**, 113, 7.
- [50] R. Krogh-Madsen, J. P. Thyfault, C. Broholm, O. H. Mortensen, R. H. Olsen, R. Mounier, P. Plomgaard, G. van Hall, F. W. Booth, B. K. Pedersen, *Journal of Applied Physiology* **2010**, 108, 1034.
- [51] R. Pišot, U. Marusic, G. Biolo, S. Mazzucco, S. Lazzer, B. Grassi, C. Reggiani, L. Toniolo, P. E. di Prampero, A. Passaro, M. Narici, S. Mohammed, J. Rittweger, M. Gasparini, M. Gabrićelić Blenkuš, B. Šimunič, *Journal of Applied Physiology* **2016**, 120, 922.
- [52] S. G. Trost, N. Owen, A. E. Bauman, J. F. Sallis, W. Brown, *Medicine & Science in Sports & Exercise* **2002**, 34, 1996.
- [53] C. McGlory, M. T. von Allmen, T. Stokes, R. W. Morton, A. J. Hector, B. A. Lago, A. R. Rapphenya, B. K. Smith, A. G. McArthur, G. R. Steinberg, S. K. Baker, S. M. Phillips, *The Journals of Gerontology: Series A* **2018**, 73, 1070.
- [54] F. W. Booth, C. K. Roberts, J. P. Thyfault, G. N. Rueggsegger, R. G. Toedebusch, *Physiological Reviews* **2017**, 97, 1351.
- [55] M. Campbell, J. Varley-Campbell, J. Fulford, B. Taylor, K. N. Mileva, J. L. Bowtell, *Sports Medicine* **2019**, 49, 931.
- [56] K. Seki, T. Kizuka, H. Yamada, *Journal of Electromyography and Kinesiology* **2007**, 17, 113.
- [57] B. C. Clark, T. M. Manini, S. J. Bolanowski, L. L. Ploutz-Snyder, *Journal of Applied Physiology* **2006**, 101, 264.
- [58] V. Romanello, M. Sandri, *Current Hypertension Reports* **2010**, 12, 433.
- [59] M. Ried-Larsen, H. M. Aarts, M. J. Joyner, *Journal of Applied Physiology* **2017**, 123, 790.
- [60] S. Spendiff, M. Vuda, G. Gouspillou, S. Aare, A. Perez, J. A. Morais, R. T. Jagoe, M.-E. Filion, R. Glicksman, S. Kapchinsky, N. J. MacMillan, C. H. Pion, M. Aubertin-Leheudre, S. Hettwer, J. A. Correa, T. Taivassalo, R. T. Hepple, *The Journal of Physiology* **2016**, 594, 7361.
- [61] K. A. Rygiel, M. Picard, D. M. Turnbull, *The Journal of Physiology* **2016**, 594, 4499.
- [62] M. L. Dirks, B. T. Wall, B. van de Valk, T. M. Holloway, G. P. Holloway, A. Chabowski, G. H. Goossens, L. J. C. van Loon, *Diabetes* **2016**, 65, 2862.
- [63] C. F. Fitzsimons, G. Baker, S. R. Gray, M. A. Nimmo, N. Mutrie, *BMC Public Health* **2012**, 12, 206.
- [64] N. A. Maffiuletti, M. Barbero, C. Cescon, R. Clijsen, M. Beretta-Piccoli, A. Schneebeli, S. Preiss, D. Togninalli, *Journal of Electromyography and Kinesiology* **2016**, 28, 31.
- [65] P. Aagaard, E. B. Simonsen, J. L. Andersen, P. Magnusson, P. Dyhre-Poulsen, *Journal of Applied Physiology* **2002**, 92, 2309.
- [66] J. Lundbye-Jensen, J. B. Nielsen, *The Journal of Physiology* **2008**, 586, 4121.
- [67] A. H. Dewolf, Y. P. Ivanenko, K. E. Zelik, F. Lacquaniti, P. A. Willems, *Journal of Neurophysiology* **2019**, 122, 872.
- [68] D. Farina, F. Negro, S. Mucelli, R. M. Enoka, *Physiology* **2016**, 31, 83.
- [69] E. v. Stålberg, M. Sonoo, *Muscle & Nerve* **1994**, 17, 1135.
- [70] C. Soendenbroe, C. J. L. Bechshøft, M. F. Heisterberg, S. M. Jensen, E. Bomme, P. Schjerling, A. Karlsen, M. Kjaer, J. L. Andersen, A. L. Mackey, *Cells* **2020**, 9, 893.
- [71] M. Salanova, E. Bortoloso, G. Schiffil, M. Gutschmann, D. L. Belavy, D. Felsenberg, S. Furlan, P. Volpe, D. Blottner, *The FASEB Journal* **2011**, 25, 4312.
- [72] M. Salanova, P. Volpe, D. Blottner, *IUBMB Life* **2013**, 65, 769.
- [73] S. R. Iyer, S. B. Shah, R. M. Lovering, *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, 22, 8058.
- [74] S. Hettwer, P. Dahinden, S. Kucsera, C. Farina, S. Ahmed, R. Fariello, M. Drey, C. C. Sieber, J. W. Vrijbloed, *Experimental Gerontology* **2013**,

- 48, 69.
- [75] T. Krüger, J. Lautenschläger, J. Grosskreutz, H. Rhode, *PROTEOMICS - Clinical Applications* **2013**, 7, 123.
 - [76] K. A. Rygiel, M. Picard, D. M. Turnbull, *The Journal of Physiology* **2016**, 594, 4499.
 - [77] B. Grassi, V. Quaresima, *Journal of Biomedical Optics* **2016**, 21, 091313.
 - [78] L. Zuccarelli, S. Porcelli, L. Rasica, M. Marzorati, B. Grassi, *Medicine & Science in Sports & Exercise* **2018**, 50, 1649.
 - [79] J. R. Gifford, R. S. Richardson, *Journal of Applied Physiology* **2017**, 123, 1708.
 - [80] B. GRASSI, S. PORCELLI, M. MARZORATI, *Medicine & Science in Sports & Exercise* **2019**, 51, 2183.
 - [81] L. Zuccarelli, P. C. do Nascimento Salvador, A. del Torto, R. Fiorentino, B. Grassi, *Journal of Applied Physiology* **2020**, 128, 534.
 - [82] D. Salvadego, M. E. Karamidas, R. Kölegård, L. Brocca, S. Lazzer, I. Mavelli, J. Rittweger, O. Eiken, I. B. Mekjavic, B. Grassi, *The Journal of Physiology* **2018**, 596, 3341.
 - [83] M. L. Dirks, P. M. Miotto, G. H. Goossens, J. M. Senden, H. L. Petrick, J. Kranenburg, L. J. C. Loon, G. P. Holloway, *The Journal of Physiology* **2020**, 598, 123.
 - [84] P. Bernardi, A. Rasola, M. Forte, G. Lippe, *Physiological Reviews* **2015**, 95, 1111.
 - [85] G. Biolo, F. G. di Girolamo, A. McDonnell, N. Fiotti, F. Mearrelli, R. Situlin, A. Gonelli, B. Dapas, M. Giordano, M. Lainscak, G. Grassi, G. Zauli, P. Secchiero, I. Mekjavic, *Frontiers in Physiology* **2018**, 9, DOI 10.3389/fphys.2018.01000.
 - [86] F. Agostini, L. D. Libera, J. Rittweger, S. Mazzucco, M. Jurdana, I. B. Mekjavic, R. Pišot, L. Gorza, M. Narici, G. Biolo, *The Journal of Physiology* **2010**, 588, 5089.
 - [87] F. G. di Girolamo, S. Mazzucco, R. Situlin, N. Mohorko, Z. Jenko-Pražnikar, A. Petelin, M. Tence, R. Pišot, L. Navarini, G. Biolo, *Nutrition* **2016**, 32, 928.
 - [88] N. Stojanovic, K. Lewandowski, I. Salata, M. Bienkiewicz, S. Tuck, G. Prelevic, M. Press, *Gynecological Endocrinology* **2009**, 1.
 - [89] E. Monti, C. Reggiani, M. v. Franchi, L. Toniolo, M. Sandri, A. Armani, S. Zampieri, E. Giacomello, F. Sarto, G. Sirago, M. Murgia, L. Nogara, L. Marcucci, S. Ciciliot, B. Šimunic, R. Pišot, M. v. Narici, *The Journal of Physiology* **2021**, 599, 3037.
 - [90] B. C. Clark, L. C. Issac, J. L. Lane, L. A. Damron, R. L. Hoffman, *Journal of Applied Physiology* **2008**, 105, 868.
 - [91] K. Seki, Y. Taniguchi, M. Narusawa, *The Journal of Physiology* **2001**, 530, 507.
 - [92] C. Moisello, M. Bove, R. Huber, G. Abbruzzese, F. Battaglia, G. Tononi, M. F. Ghilardi, *Journal of Motor Behavior* **2008**, 40, 165.
 - [93] M. R. Deschenes, H. L. Tufts, A. L. Noronha, S. Li, *Biogerontology* **2019**, 20, 213.
 - [94] R. Demangel, L. Treffel, G. Py, T. Brioché, A. F. Pagano, M.-P. Bareille, A. Beck, L. Pessemesse, R. Candau, C. Gharib, A. Chopard, C. Millet, *The Journal of Physiology* **2017**, 595, 4301.
 - [95] S. Hettwer, P. Dahinden, S. Kucsera, C. Farina, S. Ahmed, R. Fariello, M. Drey, C. C. Sieber, J. W. Vrijbloed, *Experimental Gerontology* **2013**, 48, 69.
 - [96] M. D. de Boer, C. N. Maganaris, O. R. Seynnes, M. J. Rennie, M. v. Narici, *The Journal of Physiology* **2007**, 583, 1079.
 - [97] N. A. Maffiuletti, P. Aagaard, A. J. Blazevich, J. Folland, N. Tillin, J. Duchateau, *European Journal of Applied Physiology* **2016**, 116, 1091.
 - [98] J. R. Speakman, C. Selman, *Proceedings of the Nutrition Society* **2003**, 62, 621.
 - [99] P. Guinet, J. P. MacNamara, M. Berry, F. Larcher, M.-P. Bareille, M.-A. Custaud, A. Pavy-Le Traon, B. D. Levine, N. Navasolava, *Frontiers in Physiology* **2020**, 11, DOI 10.3389/fphys.2020.00812.
 - [100] Y. Kawakami, H. Akima, K. Kubo, Y. Muraoka, H. Hasegawa, M. Kouzaki, M. Imai, Y. Suzuki, A. Gunji, H. Kanehisa, T. Fukunaga, *European Journal of Applied Physiology* **2001**, 84, 7.
 - [101] Y. Ishizaki, H. Fukuoka, T. Katsura, Y. Nishimura, M. Kiriya, M. Higurashi, Y. Suzuki, K. Kawakubo, A. Gunji, *Acta physiologica Scandinavica. Supplementum* **1994**, 616, 83.
 - [102] P. T. Reidy, A. I. McKenzie, Z. Mahmassani, V. R. Morrow, N. M. Yonemura, P. N. Hopkins, R. L. Marcus, M. T. Rondina, Y. K. Lin, M. J. Drummond, *The Journal of Physiology* **2018**, 596, 5217.
 - [103] B. Šimunič, H. Degens, J. Rittweger, M. Narici, I. B. Mekjavic, R. Pišot, *Medicine & Science in Sports & Exercise* **2011**, 43, 1619.

Koper, 1.6.2023