

PROTOKOL RAZISKAVE

Ležanje v postelji SBI 2023

Kontaktna oseba: Prof. dr. Boštjan Šimunič
E-pošta: bostjan.simunic@zrs-kp.si
Mobilni telefon: +386 31 832 016

Delovni naslov: LEŽANJE V POSTELJI SBI 2023

Odgovorni zdravnik: doc. dr. Mladen Gasparini, MD.

Začetek študije: 1.9.2023

Konec študije: 1.11.2023

Financiranje študije:

- projekt ARIS (vodja: prof. dr. Boštjan Šimunič; J5-4593 Živčno mišična okvara, povzročena z neaktivnostjo: primerjava mlajših in starejših odraslih),
- projekt PRIN (vodja: prof. dr. Marco Narici; InactivAge – Živčno mišična okvara, povzročena z neaktivnostjo v različnih starostnih obdobjih: od otrok do mladih in srednje starih odraslih) ter
- projekt INTERREG SLO-ITA (vodja prof. dr. Gianni Biolo, MD, in koordinator študije prof. dr. Rado Pišot; X-BRAIN.net – Mreža čezmejnega sodelovanja pri rehabilitaciji bolnikov po možganski kapi z uporabo inovativnih tehnologij).

Posodobitev kliničnega protokola MEMORI.net:

Klinični protokol MEMORI.net bo posodobljen na podlagi novih znanstvenih spoznanj o vplivu kratkotrajne telesne neaktivnosti na naše zdravje. Znanstveno bomo ocenili poslabšanje zdravstvenega stanja med 10-dnevno telesno neaktivnostjo z intervencijami in brez njih. Intervencije bodo temeljile na kognitivnih dražljajih ter na prehranskih dopolnilih.

Kratka (<10 dni) obdobja telesne neaktivnosti so po možganski kapi zelo pogosta. V tem obdobju poteka podrobna diagnostika, prav tako pa se bolniki soočajo s psihološkim stresom. Vendar se zdi, da je to obdobje ključno za sekundarno poslabšanje zdravstvenega stanja in zamude pri zdravljenju primarne možganske kapi, kar bi lahko vplivalo na prognozo in rezultate rehabilitacije. Tudi zelo kratka

Projektni partnerji:

obdobja telesne neaktivnosti negativno vplivajo na naše zdravje, še posebej pri starejših bolnikih. To ima dodatni, sekundarni učinek v obliki izrazitega poslabšanja zdravja, kar lahko vodi do nepopravljivega poslabšanja, iz katerega mnogi ljudje ne najdejo izhoda. Na podlagi pregleda najnovejše znanstvene literature bomo ponovno pregledali in izbrali najboljše vadbene in kognitivne intervencije, ki smo jih skupaj razvili v okviru projekta MEMORI.net, ter jih dopolnili s prehranskimi intervencijami, ki lahko zmanjšajo patofiziološke spremembe zaradi telesne neaktivnosti v prvi fazi funkcionalne rehabilitacije po možganski kapi. Za oceno učinkovitosti funkcionalne rehabilitacije bomo opredelili protokol za klinično študijo telesne neaktivnosti pri udeležencih iz iste starostne skupine, v kateri se možganska kap najpogosteje pojavlja. Poleg tega bomo opredelili vse postopke ocenjevanja zdravstvenega stanja, ki jih je treba opraviti pred in po študiji telesne neaktivnosti.

Kratek opis, utemeljitev, znanstveno ozadje:

Čeprav se telesna neaktivnost (TN) uvršča na 2. mesto med dejavniki tveganja za splošno umrljivost (poročilo WHO 2019), s 7. mesta v letu 2006, je treba poudariti, da je to najlažje spremenljiv dejavnik zdravja v vseh starostnih skupinah. Vplivi TN (tihega morilca) lahko ostanejo neopaženi več let ali desetletij, preden se iz nje razvije bolezen, ki bi jo bilo mogoče preprečiti. TN je povezana s zgodnjim pojavom neprehodnih kroničnih bolezni, ki vodijo do zdravstvenih težav in umrljivosti zaradi vseh vzrokov. Poleg tega **je TN neodvisni dejavnik našega zdravja**, saj kaže šibko korelacijo z zmerno do intenzivno telesno aktivnostjo (MVPA) **in predstavlja največjo grožnjo za naše zdravje**. Pri aktivnih in neaktivnih populacijah opazimo vse daljša obdobja TN. Nedavna študija mladih univerzitetnih športnikov in njihovih neaktivnih vrstnikov je poudarila visoke dnevne vrednosti, pri čemer ni bilo razlike v povprečnih vrednostih časa sedenja ($11,0 \pm 3,0$ ur) med obema skupinama ^[1]. Športniki so lahko hkrati zelo aktivni in zelo sedeči, zato moramo upoštevati neto učinek obeh dejavnikov na njihovo zdravje. Pri tem je pomembno vedeti, da je čas sedenja >20-krat prisotnejši od MVPA, saj ta pri odraslih znaša le 22 ± 15 minut na dan (poročilo WHO 2019). In dejansko bi ukrepi lahko prinesli boljše rezultate, če bi se osredotočali na zmanjšanje TN/sedečega časa, namesto da bi spodbujali izključno MVPA.

Številne znanstvene publikacije obravnavajo TN kot pandemijo, kar podpira objavo Svetovnega akcijskega načrta WHO za telesno aktivnost 2018–2030. Cilj tega dokumenta je doseči relativno zmanjšanje GN za 10 % do leta 2025 in za 15 % do leta 2030, kar bo prispevalo k daljši pričakovani življenjski dobi in višji kakovosti življenja prebivalstva. V podporo temu so številne študije pokazale, da so posledice GN za telesno in duševno zdravje prav tako resne, mehanizmi poslabšanja pa so zelo hitri, še zlasti kadar je GN povezana s staranjem ali spremljajočimi boleznimi. **GN ima negativen vpliv na večino podsistemov človeškega telesa**, med katerimi so bile poročane negativne posledice na:

- mišično maso in zgradbo ^[2–5];
- mišične funkcije ^[2,6];

Projektni partnerji:

- kosti ^[7,8] ;
- presnovno beljakovin ^[9,10] ;
- celični oksidativni metabolizem ^[11,12] ;
- učinkovitost nevronske obdelave ^[13] ter kognitivne funkcije ^[14,15] ter
- kardiovaskularne in dihalne funkcije ^[16] .

Poleg tega **so zaradi** nedavne **pandemije COVID-19 priporočila javnega zdravja in vladni ukrepi uvedli zapore in omejitve gibanja**. Čeprav te omejitve pomagajo zmanjšati stopnjo okužb, imajo takšne omejitve negativne učinke, saj omejujejo sodelovanje v običajnih vsakodnevnih dejavnostih, telesni aktivnosti, potovanjih in dostopu do številnih oblik vadbe. Na svetovni ravni je multicentrična študija, izvedena v 22 državah, pokazala, da je omejitev gibanja zaradi COVID-19 imela srednje do velike (23–43 %) negativne učinke na vse ravni telesne aktivnosti (intenzivno, zmerno, hoja in skupno) ter povzročila veliko povečanje dnevnega časa sedenja (28 %) pri odraslih ^[17] . Takšna nenadna povečanja GN vodijo do hitrega izgubljanja mišične mase, ki je zaznavno že v samo 2 dneh in je povezano z denervacijo mišičnih vlaken, poškodbo živčno mišičnega stika (NMJ) ter povečano razgradnjo beljakovin, vendar se večinoma pojasnjuje z zaviranjem sinteze mišičnih beljakovin. GN vpliva tudi na homeostazo glukoze in zmanjšuje občutljivost na inzulin, predvsem v mišicah. Poleg tega je aerobna zmogljivost oslABLJENA na vseh ravneh O₂-kaskade, od srčnožilnega sistema, vključno s perifernim krvnim obtokom, do oksidativne funkcije skeletnih mišic. Pozitivna energijska bilanca med GN je povezana z nalaganjem maščob, kar je povezano s sistemskim vnetjem in aktivacijo antioksidativnih obrambnih mehanizmov, kar dodatno poveča izgubo mišične mase ^[18] .

Opredelitev problema:

- Dejavnosti projekta **se bodo osredotočile na živčno mišično in presnovno poslabšanje med GN ter na poznejšo obnovo**. Učinki GN se preučujejo z uporabo različnih modelov, pri čemer je **ležanje v postelji (BR)** zlati standard, ki ga je le malo ustanov uspelo razviti v kompleksnem bolnišničnem okolju. Slednji je namenjen ne le ocenjevanju učinkov neaktivnosti same po sebi, temveč tudi preučevanju učinkovitosti metod, vključno s treningom in rehabilitacijo, za obravnavo mišične atrofije in disfunkcije, ki ju povzročata neaktivnost in neuporaba ^[19,20] .
- **Neuporaba skeletnih mišic spremlja morfološki in funkcionalni upad** ^[21–25] . Zmanjšanje mišične mase poteka zelo hitro: v zgolj dveh dneh imobilizacije s kolensko oporo ^[26] ali po treh dneh suhega potopitve ^[27] se izgubi približno 2 % preseka kvadricepsa (CSA), po 14 dneh enostranske suspenzije spodnjega uda ^[21] pa se izgubi približno 5 %. Pomembno je, da je s tem povezana izguba mišične moči znatno večja od izgube mišične mase, in sicer približno 9 % po 3-dnevnem suhem potopu ^[27] ali 5-dnevni imobilizaciji ^[28] ter 15–27 % po 14 ali več dneh razbremenitve ^[21,23,29–31] . Takšna izguba mišične sile pa je povezana s še večjo izgubo mehanske moči ^[32–34] , ki je najpomembnejši parameter za učinkovito izvajanje večine gibalnih dejavnosti v vsakdanjem življenju. Na ravni posameznega mišičnega vlakna se zmanjša specifična sila (Po), ki je posledica večjega upada izometrične

Projektni partnerji:

sile Fo (v primerjavi s CSA) je glavni dejavnik, ki določa izgubo največje moči, medtem ko je največja hitrost krčenja vlakna manj občutljiva na neuporabo [24,35,36] .

- Ker je **kratkotrajna (7–15 dni) neuporaba pogosto stanje, s katerim se srečujejo tako mladi kot starejši ljudje**, ko so priklenjeni na posteljo zaradi poškodbe [37] ali operacije [38] , ter kritično bolni pacienti [39] , je preučevanje možnih determinant nesorazmernega zmanjšanja mišične sile v primerjavi z zmanjšanjem mišične mase zelo pomembno. Poleg tega se je le malo študij ukvarjalo z medsebojnim delovanjem med mišičnim in živčnim nadzorom prek senzomotoričnih zank in nevromuskularnih spojev pri povzročanju neznosnosti telesne vadbe in presnovne okvare celotnega telesa ter z mehanizmi, ki temu ležijo v ozadju. PI prizadene vse starostne skupine. O vplivu PI pri starejših odraslih (55–65 let) je znanega le malo. Nedavni izbruh COVID-19 je povzročil PI pri milijonih ljudi vseh starosti po vsem svetu [17,18,40] in poudaril njegove škodljive posledice.
- Vendar pa še **vedno manjka jasna in izčrpna razlaga, zakaj se kontraktilna sila zmanjšuje hitreje kot mišična masa**. Le delni odgovori so bili pridobljeni z analizo procesa generiranja sile mišičnega vlakna [25,41–44] ter prenosa sile prek ekstracelularne matrice in vezivnih kit [21,45,46] na kosti. Možen namig je dala nedavna študija [27], ki je pokazala, da **lahko suha potopitev, skrajna oblika neuporabe, v samo 3 dneh povzroči zelo zgodnjo in delno napredovanje denervacije vlaken**. Ta ugotovitev je v skladu s prejšnjimi opazovanji o vplivu 14-dnevne BR pri skupini moških in žensk v šestem desetletju življenja, ki so zato nagnjeni k starostnim spremembam NMJ [47] . Na podlagi teh premislekov bomo nadalje raziskovali stabilnost NMJ, ki predstavlja povezavo med mišicami in živci, povezano z inervacijo mišičnih vlaken. Poleg tega si bomo prizadevali razširiti analizo navzgor na prostovoljno zmožnost aktivacije mišic v centralnem živčnem sistemu in navzdol na intracelularne kalcijeve signale, s čimer bomo povezali akcijski potencial, sprožen na NMJ, z miofibrilarnimi motorji.

Čeprav **GN vpliva na večino organskih sistemov, so poslabšanje mišične mase in moči, živčno mišičnega nadzora ter energijskega metabolizma, glavne ugotovitve** [54] . Poleg tega GN povzroča vrsto odzivov, ki vključujejo živčni sistem, metabolizem in srčnožilni sistem. Nekatera vprašanja še vedno niso v celoti razjasnjena, zlasti pri ljudeh:

- a) mehanizmi nesorazmerne izgube sile v primerjavi z mišično maso [55,56] .
- b) relativna vloga somatomotoričnega nadzora, NMJ, mišic in energijskega metabolizma pri motnjah gibanja [54, 57, 58] in mišičnega dela [59] .
- c) medsebojno vplivanje živcev in mišic pri nestabilnosti NMJ [60] .
- d) mehanizmi, odgovorni za motnje oksidativnega metabolizma, ter povezava z razvojem živčno mišičnih sprememb [61] in insulinske rezistence [62] .

Čeprav so cilji in naloge zapisani le v zvezi z neuporabo (glavni namen projekta), bomo enako pomembno preučevali tudi poznejše okrevanje. Za obravnavo teh vprašanj bomo

Projektni partnerji:

prek 10 medsebojno povezanih nalog pri mladih in odraslih srednjih let v modelu BR zasledovali 3 specifične cilje:

Tako bomo zasnovali **21-dnevno horizontalno BR (z 21-dnevnim okrevanjem) pri 10 zdravih mlajših moških** (18–30 let) in **10-dnevno horizontalno BR (z 21-dnevnim okrevanjem) pri 10 zdravih starejših moških** (65–75 let), da bi pridobili dodatne vpoglede v zgodnje determinante izrazite izgube mišičnega volumna, moči in eksplozivnosti, povezane z razbremenitvijo. V skladu s tem bomo preučili morfologijo, celovitost in delovanje nevromišičnega sistema pred, med in ob koncu obdobja bremenitve. Preverili bomo hipoteze, da (i) se lahko kmalu po izpostavljenosti bremenitvi razvije zgodnja okvara živčno mišičnega prenosa, verjetno zaradi nestabilnosti NMJ, (ii) da je okvarjen živčno mišični prenos lahko spremljajo spremembe kalcijevega signaliziranja znotraj mišičnih vlaken, (iii) da takšne spremembe lahko spremljajo okvare v zmožnosti aktivacije ter (iv) da obstajajo razlike v upadu in zmožnosti ponovnega treninga med mlajšimi in starejšimi odraslimi.

Cilji in pričakovani rezultati:

Naloga 1: *mišični volumen, zgradba, kontraktilnost, moč in eksplozivna moč*

Ocenili bomo: (i) spremembo mišičnega volumna celotnega telesa in kvadricepsa; (ii) spremembo mišične arhitekture v 4 skeletnih mišicah nog; (iii) mehanske kontraktilne lastnosti v 4 skeletnih mišicah nog; (iv) spremembe prostovoljne mišične moči in eksplozivne moči kvadricepsa.

Pričakovani rezultati. Pri starejših odraslih pričakujemo do 50 % večje poslabšanje v primerjavi z mlajšimi odraslimi pri enako dolgi izpostavljenosti BR (10 dni). Poleg tega bodo starejši odrasli imeli manjšo sposobnost rehabilitacije kot mlajši odrasli.

Naloga 2: *velikost mišičnih vlaken, sila, napetost, hitrost, zunajcelična matrica s citoskeletom in sestava MHC*

Ocenili bomo: (i) prečni prerez mišičnih vlaken; (ii) hitrost, silo in specifično napetost; (iii) dinamiko kalcija na podlagi odziva na kofein; (iv) krivuljo sile-pCa; (v) porazdelitev izoform težke verige miozina; (vi) sestavine zunajcelične matrice in citoskelet.

Pričakovani rezultati. Podobno kot v nalogi 1 pričakujemo podobne ugotovitve tudi na ravni mišičnih vlaken, tj. večji vpliv BR na delovanje mišičnih vlaken pri starejših odraslih. Ne pričakujemo sprememb v deležu težke verige miozina po BR pričakujemo pa spremembe v sestavi zunajcelične matrice in citoskeleta.

Naloga 3 *Supraspinalna in spinalna vzburljivost*

Bomo: (i) uporabili tehniko interpoliranega dvojnega krčenja ^[64] za oceno centralne aktivacije, kar je ocena celovitosti somatomotoričnega nadzora od motoričnega korteksa do α -motonevronov; (ii) preučili hitrost razvoja sile in čas relaksacije z električno sproženimi krčenji za oceno sprememb v kontraktilnosti mišic, kar je posredna ocena učinkovitosti E-C-vezave; (iii) preučili H-refleks, V-val in M-val ^[65] za oceno plastičnih sprememb v hrbtenjačnih nevronskih vezjih, odgovornih za presinaptični in postsinaptični nadzor hrbtenjače ^[66].

Projektni partnerji:

Naloga 4: *Vzorci živčno mišične aktivacije in hrbtenjačne karte*

Zabeležili bomo površinski EMG več mišic iz 16 mišic spodnjih okončin, izračunali časovne vzorce mišičnih aktivacij, mišične sinergije ter prostorsko-časovne hrbtenjačne zemljevide, da bi opisali izhod alfa-motonevronov ^[67].

Naloga 5: *Delovanje motoričnih enot in funkcija NMJ*

Preučili bomo časovni potek prilagajanja na zmanjšano aktivnost več posameznih motornih enot (časi izpraznjenja (MUDR), pragi aktivacije (RT) in hitrost prevajanja (MUCV)) z uporabo najnovejših tehničnih dosežkov na področju EMG-zapisov (npr. površinski EMG visoke gostote (HD-EMG)) in dekompozicije ^[68]. Prilagoditve v delovanju NMJ bomo ocenili s pomočjo kvantitativnih tehnik igelne elektromiografije, ki odražajo lastnosti potencialov motoričnih enot (tehnika MUNE), da bi ocenili parametre jitterja in jiggleja, ki so sprejeti kazalniki učinkovitosti prenosa na NMJ ^[69].

Pričakovani rezultati. Pričakujemo, da bo BR vodil v povečanje pragov rekrutiranja MU in da bo to povezano z zmanjšanjem tako MUDR kot MUCV. V povezavi z nalogo 5 se bo izoblikovala celovita slika prilagoditev gibalnega nadzora na neuporabo.

Cilj 2: opredelitev sprememb NMJ in njihove funkcionalne vloge

Na podlagi najnovejših ugotovitev o NMJ pri miših **postavljamo hipotezo**, da bi zelo zgodnje prilagoditve lahko na drugačni časovni osnovi privedle do: nestabilnosti NMJ, sprememb v živčno mišičnem nadzoru, insulinske rezistence in mišične atrofije.

Naloga 6: ugotoviti pojav in obseg sprememb NMJ

Ocenili bomo stabilnost NMJ z analizo: (a) ekspresije podenot AChR ^[70]; (b) signalnih komponent poti agrin/MuSK/Lrp4; (c) vsebnosti Homer 2 (molekularnega dejavnika pri prenosu sinaptičnega signala v skeletna mišična vlakna ^[71] in pri nadzoru trofizma skeletnih mišic ^[72]); (d) ekspresije mišično specifičnih mikroRNA, na katere vpliva neaktivnost in ki vplivajo na stabilnost NMJ ^[73]; (e) c-terminalni fragment agrina (CAF) v vzorcih seruma, biomarker poškodbe NMJ ^[74]; (f) kreatinin v serumu kot biomarker denervacije in atrofije mišic ^[75].

Pričakovani rezultati: kompleksne prilagoditve na več ravneh celovitosti NMJ, kot so spremenjena ekspresija in združevanje AChR-jev, nižja ekspresija Lrp4 in MuSK v mišicah ter povečane ravni CAF v krvi, kar kaže na poškodbo NMJ.

Naloga 7: *opredelitev razmerja med spremembami NMJ ter celovitostjo mišične strukture in funkcije*

Prisotnost denervacije bomo preučevali prek ravni izražanja specifičnih genov, povezanih z neaktivnostjo in denervacijo NMJ, ter pojava NCAM-pozitivnih vlaken.

Prisotnost sprememb v skeletnih mišicah bo določena glede na: (1) velikost mišičnih vlaken; (2) znotrajceličnih poti, ki uravnavajo sintezo in razgradnjo beljakovin; (3) molekularnih in

Projektni partnerji:

funkcionalne mitohondrijske prilagoditve; (4) redoksne stanja in oksidativnega stresa; (5) ravni nevrotrofinov v mišicah.

Pričakovani rezultati: pričakujemo, da bomo potrdili delovno hipotezo o vlogi osi AMPK/PGC1alfa pri povezovanju mišičnih, presnovnih in somatomotoričnih prilagoditev.

Cilj 3: opredelitev presnovne okvare: energetske in glukoze metabolizem

Oksidativni metabolizem omejuje toleranco na telesno obremenitev in delovno zmogljivost v vsakdanjem življenju, njegova motnja pa je eden glavnih dejavnikov tveganja za kronične bolezni. K motnji oksidativnega metabolizma po neaktivnosti prispevajo tako centralni (srčnožilni) kot tudi periferni dejavniki (periferni krvni pretok, endotelijska funkcija, znotrajmišično usklajevanje med dovajanjem in porabo kisika, periferna difuzija kisika, mitohondrijsko dihanje). Med perifernimi dejavniki lahko mitohondrijska disfunkcija in neravnovesje v redoks sistemu prispevata k (i) razvoju neprilagodljivih sprememb v motoričnih nevronih, NMJ in mišičnih vlaknih ^[76] ter (ii) inzulinski rezistenci ^[62].

Naloga 8: opredelitev presnovne motnje na ravni mišic in celotnega telesa

Med vadbo na kolesnem ergometru z različnimi intenzivnostmi bomo določili: (i) največjo porabo kisika; največji srčni iztis; največjo frakcijsko ekstrakcijo kisika s skeletnimi mišicami ^[77]; dihalno funkcijo in funkcijo dihalnih mišic (maksimalni vdihni in izdihni tlak) v mirovanju in po doseganju »pragov« maksimalne vadbe ^[77]; zmanjšanje delovne zmogljivosti pri srčnem utripu, ki je nekoliko višji od GET ^[78]; (ii) periferno-endotelijske funkcije žil ^[79]; (iii) znotrajmišično usklajevanje med dovajanjem in porabo kisika ^[80]; (iv) mitohondrijsko dihanje z analizo kinetičnega poteka obnovitve mišične porabe kisika ^[81].

Na mišičnih vzorcih bomo preučevali: (v) mitohondrijsko dihanje z visokoločljivo respirometrijo na permeabiliziranih mišičnih vlaknih ^[82] in občutljivost mitohondrijev na submaksimalno [ADP] ^[83], (vi) ocene mitohondrijske mase; (vii) nastajanje reaktivnih kisikovih spojin (ROS) ^[83]; (viii) dovzetnost za prehod permeabilnosti v notranji mitohondrijski membrani ^[84]; (ix) stanje sestave mitohondrijske sinteze ATP (kompleks V) in njeno interakcijo z matričnim proteinom ciklofilinom D, glavnim regulatorjem prehoda permeabilnosti ^[84].

Pričakovani rezultati: karakterizacija preiskovancev z vidika telesne zmogljivosti in tolerance; primerjava centralnih in perifernih motenj oksidativnega metabolizma ter motenj, povezanih z dovajanjem kisika, in tistih, povezanih z mitohondrijsko disfunkcijo; obseg, časovni potek in individualna obnašanja markerjev mitohondrijske disfunkcije ter njihova povezanost s spremembami v NMJ in razvojem inzulinske rezistence. Oblikovanje ostankov kompleksov sinteze ATP, ki so potencialno odgovorni za spremenjeno dihanje in/ali povečano nagnjenost sinteze ATP k prehodu iz energijsko varčnega v energijsko razsipavajočega encima, pri čemer se oblikujejo pore prehoda permeabilnosti, ter možna vloga osi AMPK/PGC1alfa pri preprečevanju teh sprememb.

Naloga 9: preučitev vloge inzulinske rezistence in reaktivnih kisikovih spojin (ROS)

Projektni partnerji:

Za oceno časovnega poteka redoksnega stanja in inzulinske rezistence bomo določili koncentracijo celotnega gama-glutamilnega cikla [Qi] v eritrocitih, razmerje GSH:GSSG ^[85] ter ekspresijo glutamil-cistein-sintetaze ^[86]. Insulinska rezistenca bo ocenjena s hiperinzulinemičnim euglikemičnim klampom in indeksom HOMA ^[87]. Poleg tega bomo raziskali mehanizme, ki vodijo do sprememb v izražanju in aktivnosti matričnih metaloproteaz ter njihovih inhibitorjev ^[88].

Pričakovani rezultati: Določitev obsega oksidativnega stresa, inzulinske rezistence in ravni MMP/TIMP ter korelacija teh ugotovitev s spremembami mišične mase, zmogljivosti in drugimi presnovnimi spremembami.

Predvidena velikost vzorca preiskovancev študije: Študija bo izvedena na 30 preiskovancih:

- MLADI: 10 mladih moških, starih 18–30 let;
- STAREJŠI: 20 starejših moških, starih 65–75 let.

Ocena statistične moči raziskave: Izračunali smo in se odločili, da bomo v obe študiji BR vključili po 10 preiskovancev. Analiza statistične moči je bila izvedena za najbolj relevanten del študij – neuporabo, na podlagi naslednjih predpostavk: $\alpha \leq 0,05$; enostranski testi, $\beta = 0,3$; $P = 0,7$, za glavne izide mišične moči, velikosti in anaerobne moči:

Izid	Pred	Po	Potrebno število udeležencev	Sklici
10-dnevni BR pri starejših				
Obseg kvadricepsa / cm ²	1667 ± 234	1525 ± 211	13	[51]
Moč kvadricepsa / N	546 ± 110	475 ± 109	11	[51]
Anaerobna moč / W/kg	35 ± 5,7	30 ± 5,7	10	[51]
Aerobna moč / ml O ₂ /kg/min	27 ± 4,9	22 ± 3,4	5	[51]
21-dnevni BR pri mladih				
Aerobna moč / ml O ₂ /kg/min	38 ± 6	31 ± 5	4	[99]
Koleno raztezalce	270 ± 30	247 ± 31	10	[100]
v / cm ³				
Moč kvadricepsa / kg				
Mišična masa nog / kg				
Moč kvadricepsa / kg				

Projektni partnerji:

Postopki: Po pridobitvi etične odobritve je bil pri 10 mladih moških (18–30 let) in 10–10-dnevni program BR pri 10 starejših odraslih (55–65 let), oboje z 21-dnevnim okrevanjem, bo organiziran v bolnišničnem okolju z 24-urnim zdravniškim nadzorom (kot v naših 5 prejšnjih študijah, ki so trajale od 10 do 35 dni BR/okrevanja). Vključili bomo zdrave preiskovance (+2 za rezervo in pilotno testiranje) z izključitvenimi merili (kajenje, redno uživanje alkohola, feromagnetni vsadki; anamneza globoke venske tromboze z D-dimerom $>500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; akutne ali kronične skeletne, živčno mišične, presnovne in srčnožilne bolezni; pljučna embolija; indeks telesne mase $>25 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$, športniki, <90 minut dnevne zmerno intenzivne telesne aktivnosti (MVPA)). Vsi preiskovanci bodo opravili kineziološki (VO_2max , test moči nog) in zdravstveni pregled (EKG v mirovanju in med vadbo, krvni tlak, zdravstveni razgovor). Po pilotnih testih na 2 rezervnih preiskovancih bosta v študijo vstopila po 2 preiskovanca dnevno, ki se bosta 2 dni privajala na bolnišnično okolje in prehrano, čemur bosta sledila 2 dneva inicialnih testiranj (BDC), pričetek ležanja, testiranja na 10 (BR10) in 21 dan (BR21) ležanja, zaključek ležanja ter 2 dneva zaključnih testiranj pred odhodom iz bolnišnice. Nato bodo sledili protokolu okrevanja (glej spodaj) in se vrnili na zadnje testiranje po 21-dnevi okrevanja (REC21). Vsi testi bodo izvedeni po istem urniku (BDC, BR10, BR21 in REC21). Med ležanjem bodo preživeli 10 (starejši preiskovanci) oziroma 21 (mlajši preiskovanci) dni v vodoravnem položaju (vodoravni gibi so dovoljeni), z enim vzglavnikom pod glavo. Da bi zmanjšali srčnožilni stres, ne bo dovoljeno nobeno dodatno dvigovanje ali spuščanje v navpični smeri. Vse dnevne aktivnosti in testi med ležanjem bodo potekali leže. Medicinska sestra in študenti bodo pomagali pri razdeljevanju hrane, osebni higieni, prevozu postelj ter nadzoru. Zdravnik bo vsak dan spremljal njihovo splošno zdravstveno stanje. Fizioterapevt bo vsak drugi dan ležanja izvajal pasivno raztezanje. Prehrana med ležanjem bo energetskega nevtralna, in sicer 1,2-kratnik bazalnega metabolizma^[9]. Vsebnost makrohranil v hrani bo določena na 60 % ogljikovih hidratov, 25 % maščob in 15 % beljakovin. Čas spanja bo med 22:00 in 07:00.

Posegi:

Dvajset starejših preiskovancev bo naključno razdeljenih v dve skupini po 10 oseb.

Eksperimentalna skupina bo imela 3 intervencije:

- 8-tedenski nadzorovan program prehabilitacije, s tremi tedenskimi 60-minutnimi vadbami. Cilj je krepitev mišic nog in srčnožilne kapacitete.
- Med obdobjem ležanja v postelji: dnevne 45-minutne kognitivne vaje z uporabo sistemov navidezne resničnosti, usmerjene v namišljeno vadbo stegenjskih mišic.
- Med obdobjem ležanja v postelji: dodatna beljakovinska prehranska dopolnila v odmerku $1,6 \text{ g/kg/dan}$ z aminokislinami ($11,4 \text{ g/dan}$ prostega levcina, $1,33 \text{ mmol/kg/dan}$ glicina, $0,81 \text{ mmol/kg/dan}$ N-acetil-cisteina).

Metode ocenjevanja

Projektni partnerji:

Vse meritve bodo izvedene v 4 časovnih točkah (BDC, BR10, BR21 in REC21), če ni drugače navedeno, glej spodaj:

- Gibalna aktivnost bomo merili s pospeškometri, nameščenimi na boku.
- Sestavo telesa (maščoba) bomo merili s standardno antropometrijo in DXA celotnega telesa.
- Mišična masa nog bo merjena s kontinuiranim MRI-skeniranjem. Nizi podatkov turbo spin-echo T1-ponderiranih posnetkov obeh stegen bodo pridobljeni v aksialni (transverzalni) orientaciji. Parametri snemanja bodo nastavljeni kot sledi. Zaporedje: vibe, TR/TE: 7,8/3,69 ms, kot preklopa: 20°, vidno polje: 450 × 337,5 mm, velikost vokslov: 0,9 × 0,9 × 6 mm, brez vmesnega razmika med rezi, debelina reza: 6 mm, pasovna širina odčitavanja 320 Hz/piksel (278 kHz). Na ustreznih slikah bodo konture kvadricepsa femoris (QF) in vastusa lateralis (VL) digitalizirane v naključnem vrstnem redu z uporabo programske opreme za analizo slik OsiriX DICOM (različica 11). V okviru skeniranja se bodo konture preseka (CSA) mišic QF in VL izvajale na vsakih dveh aksialnih slikah; prostornine VL in QF se bodo izračunale s seštevanjem serije odrezanih stožcev med dvema aksialnima slikama (~20–25 ocenjenih slik na skeniranje).
- Arhitektura mišic VL, gastrocnemius medialis, tibialis anterior in biceps femoris bo izmerjena z linearno ultrazvočno preiskavo s razširjenim vidnim poljem (EFOV) tudi na BR1, BR2, BR5, BR10 in REC2. Presek mišice QF bo izmerjen z ultrazvočnim slikanjem (Mylab70). Ultrazvočni pretvornik se bo premikal po površini kože in vzdolž zanimive ravnine (v našem primeru prečne ravnine). Med premikanjem pretvornika se bodo zaporedni posnetki snemali in s pomočjo algoritma združevali, da se pridobi panoramska slika. Različna območja zanimanja bodo določena na 30 %, 50 % (CSA50) in 70 % dolžine stegenice (merjeno od večjega trohanterja do sredine kolenske skodelice) ter označena na koži.
- Kontraktilne lastnosti bodo ocenjene vzporedno z arhitekturo v istih mišicah s pomočjo TMG. Na kratko, v vsaki mišici bo z senzorjem premika ocenjen maksimalni mehanski odziv na 1-milisekundni električni impulz, da se izmeri čas kontrakcije za oceno sestave težke verige miozina I ^[103] in zgodnjega časovnega trenutka mišične atrofije ^[4].
- Največje prostovoljne kontrakcije (MVC), hitrost razvoja sile (RFD) in aktivacijska zmogljivost bodo izmerjene v izometričnih pogojih pri kotu kolena, nastavljenem na 30 stopinj fleksije, in kolku, fiksiranem na 90 stopinjah fleksije, z uporabo po meri izdelanega kolenskega dinamometra, opremljenega s senzorjem obremenitve (RS 206–0290). Pred testiranjem bosta zagotovljena ogrevanje in seznanjanje z napravo. Izhodni signal merilne celice se bo zajemal (BIOPAC MP100, Biopac Inc.) s frekvenco 2 kHz in analiziral s programsko opremo Acknowledge. Kontrakcija z največjo vrednostjo sile bo štela za MVC. MVC kolenskih iztegovalk bo normalizirana na QF CSA, da se dobi QF-specifična sila. RFD se bo meril kot čas, potreben za doseganje 63 % MVC. Aktivacijska zmogljivost bo ocenjena z uporabo tehnike dvojne interpolirane kontrakcije.

Projektni partnerji:

- Mišična moč in funkcija bosta ocenjeni z analizo navpičnega skoka. Ti testi bodo izvedeni na platformi za merjenje sile Kistler. Roke bodo fiksirane na bokih. Zabeleženi bodo največja relativna (tj. normalizirana na telesno maso) moč in sila ter največja višina skoka.
- Vzorce mišice VL (približno 150 mg) bo izkušen kirurg odvzel s perkutano biopsijo iz desne mišice VL na začetku in koncu ležanja ter iz leve VL ob BR5. Vzorčenje z biopsijo bo potekalo po anesteziji kože, podkožnega maščobnega tkiva in mišične fascije z 2 ml lidokaina (2 %). Naredi se majhen rez za preboj kože in fascije, vzorec tkiva pa se odvzame s konhotomom po Weilu–Blakesleyju. Po biopsiji se mišični vzorci razdelijo na tri dele. Prvi del se uporabi za disekcijo posameznih mišičnih vlaken za določitev preseka (CSA), sile (Fo), specifične napetosti (Po), odziva na kofein in krivulje sile-pCa. Drugi del biopsije bo zamrznjen v izopentanu, ohlajen na tekočem dušiku in shranjen pri -80°C za naknadno imunohistokemično analizo, tretji del pa bo zamrznjen v tekočem dušiku in shranjen pri -80°C za analizo beljakovin in mRNA.
- Poskusi na posameznih vlaknih bodo izvedeni po odstranitvi kože, aktivaciji, obremenitvi in izpiranju vlaken. Svežnji mišičnih vlaken, pritrjeni naravnost na majhne Sylgardove platforme, bodo shranjeni pri -20°C v raztopini za odstranjevanje kože, pomešani z 50 % glicerola. Posamezna vlakna bodo ročno razrezana na 1–2 mm dolge segmente, na obeh koncih pa bodo pritrjene lahke aluminijaste sponke. Segmenti bodo nato preneseni v eksperimentalno napravo, nameščeni na mizico obrnjenega mikroskopa Zeiss Axiovert 25 (Zeiss, Milano, Italija) in vpeti med merilnik sile (AME-801 SensorOne, Sausalito) ter elektromagnetni vlečni mehanizem (SI, Heidelberg), opremljen z merilnikom premika. Segmenti bodo vpeti v razbremenilni raztopini pri prostem dolžinskem raztegu, nato pa raztegnjeni za $\sim 20\%$, da se doseže dolžina sarkomera blizu $2,8\ \mu\text{m}$, tj. na zgornjem robu platoja odvisnosti napetosti od dolžine. Dolžina sarkomera in 3 premeri na vodoravni ravnini, enakomerno razporejeni vzdolž segmenta, bodo izmerjeni na slikah, posnetih z visoko (320x) povečavo z digitalnim fotoaparatom (Optikam B5, Optika), CSA pa bo izračunana ob predpostavki krožne oblike in povprečena. Ko bo vsako vlakno nameščeno v napravo, bo opravilo protokol, ki vključuje sproščanje kalcija, povzročeno s kofeinom, in maksimalne aktivacije po manevru skrajšanja–ponovnega podaljšanja. Merili bomo izometrično silo (Fo) in hitrost (vo) ter hitrostno konstanto KTR ponovnega razvoja napetosti. S kofeinom povzročeno sproščanje kalcija bo preverilo delovanje sarkoplazmatskega retikuluma. Zato bodo vlakna 5 minut potopljena v posebno raztopino z vsebnostjo kofeina od 4 mM do 20 mM, da se sproži maksimalno sproščanje.
- Molekulo adhezije živčnih celic (NCAM) bomo zaznali z imunohistokemijo na mišičnih vzorcih. Zamrznjene vzorce bomo razrezali na $8\ \mu\text{m}$ debele reze. Zaznavanje in kvantifikacijo denerviranih mišičnih vlaken bomo izvedli z imunološkim označevanjem NCAM. Na kratko, krioreze bomo fiksirali v hladnem metanolu 10 minut pri

Projektni partnerji:

20 °C, oprani, označeni z protitelesom proti NCAM in izprani. NCAM-pozitivna vlakna bodo prešteta na zajetih slikah z uporabo programske opreme Image in izražena kot število pozitivnih mišičnih vlaken na skupno število mišičnih vlaken, odkritih na območju biopsije z barvanjem z lamininom.

- Vzorci krvi bodo odvzeti iz medialne kubitalne vene vsakega udeleženca ob 07:00 na dnevih BR0, BR5 in REC21. Po odvzemu krvi bodo vzorci centrifugirani (CENTRIC 400, Tehnica Železniki) pri 2480 g 10 minut, da se ločita serum in plazma. Po tem postopku bodo pripravljene 500 µl alikvotne seruma in plazme, ki bodo ohlajene in shranjene pri -80 °C do analize.
- Koncentracija C-terminalnega agrinskega faktorja (CAF) v serumu bo določena z uporabo kompleta za encimsko imunske analize (ELISA) (Human Agrin SimpleStep ELISA, Ab216945) v skladu z navodili proizvajalca. Določene koncentracije CAF bodo izmerjene z bralnikom ELISA za mikroplošče (Tecan, Infinite M200). Za oceno koncentracij CAF v serumu bo pripravljena standardna krivulja (z znanimi in naraščajočimi koncentracijami CAF), ki bo odčitana pri 450 nm. Koncentracije CAF v serumu bodo interpolirane iz standardne krivulje CAF in popravljene glede na razredčitev vzorca.

Viri:

- [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. Simunic, 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. Simunic, 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. Lanfrancini, 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. Marušič, 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. Aloisco, 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.

Projektni partnerji:

- [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, *Časovna mišično specifična atrofija zaradi neuporabe med enotedensko imobilizacijo nog*, **2020**.
- [27] R. Demangel, L. Treffel, G. Py, T. Brioche, 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. Dirs, 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. Šimunič, R. Pišot, 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, *Odnosi med silo, hitrostjo, močjo ter silo in PCa v človeških soleusnih vlaknih po 17 dneh ležanja v postelji*, **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. Wegrzyn, 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. Agle, 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. Larras, 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. Lambolay, 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. Gabrijelečič Blenkus, 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. Dirs, 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. Clijns, 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. Muceli, 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. Schiff, 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.

Projektni partnerji:

- [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. Salvadeo, M. E. Keramidias, 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. Mearelli, 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. Šimunić, 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. Šimunić, H. Degens, J. Rittweger, M. Narici, I. B. Mekjavic, R. Pišot, *Medicine & Science in Sports & Exercise* **2011**, 43, 1619.

Koper, 1.6.2023

Projektni partnerji:



Projekt X-BRAIN.net sofinancira Evropska unija v okviru programa Interreg VI-A Italija–Slovenija
Projekt X-BRAIN.net sofinancira Evropska unija v okviru programa Interreg VI-A Italija–Slovenija

www.ita-slo.eu/x-brainnet