

**Akademia Wychowania Fizycznego
im. Jerzego Kukuczki w Katowicach
Wydział Wychowania Fizycznego**

Olga Łakomy

**SUPLEMENTACJA KOMPLEKSEM LIPIDOWYM
A STATUS ANTYOKSYDACYJNY KRWI I WYSTĘPOWANIE
BÓLU MIĘŚNIOWEGO U BIEGACZY
DŁUGODYSTANSOWYCH**

Rozprawa na stopień doktora nauk o kulturze fizycznej

Promotor
dr hab. Ewa Sadowska-Krępa, prof. AWF

Katowice 2021

Podziękowania dla Pani *dr hab. Ewy Sadowskiej-Krępy, prof. nadzw.*
za nieocenioną pomoc merytoryczną udzieloną w trakcie
przygotowywania pracy doktorskiej, poświęcony czas, a także za wyjątkową
serdeczność i wyrozumiałość
dla - nie zawsze mającej czas – doktorantki.

Szczególne podziękowania składam również *Pani profesor dr hab. Aleksandrze Żebrowskiej*
za pomoc w podjęciu pewnej ważnej decyzji, a następnie
za olbrzymie wsparcie i motywację, na każdym etapie pracy.

Iwonie i Wojtkowi – za pomoc.
Tą wyrażoną w godzinach opieki nad moimi Skarbami i tą,
której w żadnych jednostkach zmierzyć się nie da...

WPROWADZENIE	6
1. CZĘŚĆ PRZEGLĄDOWA	10
1.1 Zmiany czynnościowe układu mięśniowego	10
1.1.1 Zmęczenie w biegach długodystansowych	13
1.2. Stres oksydacyjny i odpowiedź układu immunologicznego na wysiłek fizyczny	19
1.3. Rola suplementacji w profilaktyce zmęczenia	23
1.3.1. Działanie Lyprinolu	26
2. CEL PRACY	28
3. MATERIAŁ I METODY BADAŃ	30
3.1. Charakterystyka badanych	30
3.2. Protokół badań	32
3.3. Badania antropometryczne i ocena składu ciała	34
3.4. Badania fizjologiczne	35
3.5. Analiza biochemiczna	36
3.6. Test wysiłkowy o charakterze pracy ekscentrycznej	39
3.7. Ocena progu bólu	39
3.8. Ocena napięcia mięśniowego	40
3.9. Suplementacja	40
3.10. Analiza statystyczna	41
4. WYNIKI	42
4.1. Wpływ suplementacji kompleksem lipidowym na indeks kwasów tłuszczowych u biegaczy długodystansowych	42
4.2. Wpływ suplementacji kompleksem lipidowym na równowagę prooksydacyjno-antyoksydacyjną po wysiłku biegowym u biegaczy długodystansowych	43

4.3.	Wpływ suplementacji kompleksem lipidowym na poziom markerów uszkodzenia błon komórek po wysiłku biegowym u biegaczy długodystansowych	48
4.4.	Wpływ suplementacji kompleksem lipidowym na poziom mediatorów stanu zapalnego po wysiłku biegowym u biegaczy długodystansowych	51
4.5.	Wpływ suplementacji kompleksem lipidowym na stopień regeneracji w spoczynku i po wysiłku biegowym u biegaczy długodystansowych	53
5.	DYSKUSJA	62
5.1.	Indeks kwasów tłuszczowych u biegaczy długodystansowych po suplementacji kompleksem lipidowym	62
5.2.	Równowaga prooksydacyjno-antyoksydacyjna po wysiłku biegowym u biegaczy długodystansowych suplementowanych kompleksem lipidowym	67
5.3.	Stan funkcjonalny błon komórek mięśni szkieletowych po wysiłku biegowym u biegaczy długodystansowych suplementowanych kompleksem lipidowym	72
5.4.	Poziom markerów stanu zapalnego po wysiłku biegowym u biegaczy długodystansowych suplementowanych kompleksem lipidowym	76
5.5.	Ocena stopnia regeneracji w spoczynku i po wysiłku biegowym u biegaczy długodystansowych suplementowanych kompleksem lipidowym	79
6.	WNIOSKI	89
7.	PIŚMIENNICTWO	91
8.	STRESZCZENIE	110
9.	SUMMARY	113
10.	ANEKS	116

AUC – obszar pod krzywą

AUC4R – obszar pod krzywą w badaniu mięśnia czworogłowego kończyny prawej

AUC4L - obszar pod krzywą w badaniu mięśnia czworogłowego kończyny lewej

AUC2R - obszar pod krzywą w badaniu mięśnia dwugłowego kończyny prawej

AUC2L - obszar pod krzywą w badaniu mięśnia dwugłowego kończyny lewej

CAT - katalaza

CK - kinaza keratynowa

DOMS - zespół opóźnionej bolesności mięśniowej

EIMD - ćwiczenia indukujące uszkodzenia mięśniowe

GPx - peroksydaza glutationowa

GSH - zredukowany glutation

H₂O₂ - nadtlenek wodoru

HR - częstotliwość skurczów serca

IL - interleukina

LA - mleczan

LDH - dehydrogenaza mleczanowa

MDA - dialdehyd malonowy

Mb - mioglobina

PT - próg bólu

PT4R - próg bólu w badaniu mięśnia czworogłowego kończyny prawej

PT4L - próg bólu w badaniu mięśnia czworogłowego kończyny lewej

PT2R - próg bólu w badaniu mięśnia dwugłowego kończyny prawej

PT2L - próg bólu w badaniu mięśnia dwugłowego kończyny lewej

RONs - reaktywne formy tlenu i azotu

ROS - reaktywne formy tlenu

SOD - dysmutaza ponadtlenkowa

TNF- α - czynnik martwicy nowotworów

TnT - troponina

VO₂ max - pułap tlenowy

Wprowadzenie

Biegi długodystansowe to wszystkie biegi rozgrywane na dystansie dłuższym niż 3000 m. Szczególnym rodzajem takiego biegu jest bieg ultramaratoński, zdefiniowany jako dowolne wydarzenie sportowe obejmujące dystans biegowy dłuższy niż tradycyjny maraton o długości 42,195 km. Alternatywnie, za ultramaraton przyjmuje się każdą konkurencję biegową trwającą dłużej niż sześć godzin (*Knechtle i Nikolaidis, 2015*).

Ultramaratony mogą być rozgrywane jako wyścigi o określonej odległości (w kilometrach lub milach) lub czasie (w godzinach lub dniach). Najczęściej organizowane są na dystansach 50 km, 100 km, 50 mil i 100 mil lub trwające 6, 12, 24 lub 48 godzin. Najdłuższe ultramaratony obejmują dystans nawet 3100 mil i mogą odbywać się na przestrzeni 10 dni. Duże zróżnicowanie tej dyscypliny biegowej wynika również z lokalizacji biegu. W odróżnieniu od maratonu, który jest biegiem typowo szosowym, ultramaraton rozgrywany jest w terenie, a trasa biegu może przebiegać zarówno płaskimi, polnymi ścieżkami, jak i górzystymi szlakami (*Millet i Millet, 2012; Knechtle i Nikolaidis, 2015*). Zwykle charakteryzuje się większą różnicą wysokości niż maraton, z ostrymi podbiegami wymuszającymi zmienną intensywność biegu i technicznymi zbiegami wymagającymi jeszcze lepszego przygotowania motorycznego. Organizatorzy ultramaratonów wciąż podnoszą poprzeczkę wydłużając dystans bądź wybierając trudniejsze trasy wyścigu - coraz częściej rodzi się więc pytanie o granice możliwości ludzkiej wytrzymałości (*Bassett i Howley, 2000*). Do tego rosnąca ilość chętnych podejmujących wyzwanie ultramaratonu zdaje się potwierdzać hipotezę o ewolucji wytrzymałościowej człowieka (*Noakes, 2006*). Ultramaratony, niebędące dyscypliną olimpijską przyciągają coraz więcej biegaczy amatorów – w wyścigu może wystartować każdy, choć ze względów bezpieczeństwa liczba miejsc jest zwykle ograniczona i konieczne jest spełnienie odpowiednich kwalifikacji.

Swoich możliwości w ultramaratonie może spróbować każdy, jednak o jego wyniku decydują pewne predyspozycje. Kluczowa jest wydolność fizyczna będąca wynikiem możliwie najbardziej efektywnego działania układu mięśniowego i układów współdziałających w pokrywaniu zapotrzebowania energetycznego (*Joyner i Coyle, 2008*). Krytycznymi wskaźnikami fizjologicznymi dla wydajności w bieganiu są maksymalne zużycie tlenu (VO_{2max}), a także procentowe jego wykorzystanie (*Levine, 2008*). Powołując się na dane z publikacji dotyczącej światowej klasy maratończyków wysokość pułapu tlenowego w tej grupie wynosiła średnio 79,6 ml/kg/min u mężczyzn i 62,2 ml/kg/min u kobiet (*Billat i wsp. 2001*), przy czym biegacze długodystansowi odstają wynikami VO_{2max} od kolarzy czy biegaczy narciarskich. Na uwagę zasługuje fakt, że rekordzistami wśród biegaczy, uwzględniając

VO_{2max} , są właśnie biegacze „ultra”: Matt Carpenter (92 ml/kg/min) i Kilian Jornet (89,5 ml/kg/min). Należy też pamiętać, że VO_{2max} świadczy o potencjale danego organizmu, jednak dopiero zdolność wykorzystywania tego potencjału stanowić będzie o sukcesie sportowym. Jeszcze lepszym predyktorem wyniku jest ekonomia biegu definiowana jako zapotrzebowanie organizmu na energię dla danej prędkości submaksymalnego biegu obejmująca wiele czynników fizjologicznych (m.in. procesy adaptacyjne metabolizmu mięśniowego) i biomechanicznych (bardziej wydajna mechanika ruchu prowadząca do mniejszego marnowania energii na siły hamowania i nadmierne oscylacje pionowe) (*Saunders i wsp. 2004*). Między innymi ekonomią biegu tłumaczy się dominację czarnoskórych biegaczy w biegach wytrzymałościowych (*Larsen, 2003*).

Równie ważna w uzyskaniu dobrego wyniku jest sprawność w funkcjonowaniu układów wyrównujących zaburzenia gospodarki wodno-elektrolitowej i kwasowo-zasadowej (*Kłapcińska i wsp. 2013; Emed i wsp. 2015; Kao i wsp. 2015; Jastrzębski i wsp. 2015; Hoffman, 2016*) Wysiłek fizyczny jest najczęstszym bodźcem fizjologicznym, który - pomimo reakcji buforowych w środowisku wewnątrz- i zewnątrzkomórkowym - powoduje czasowe zaburzenia kwasowo-zasadowe. Wielogodzinny bieg połączony z odwodnieniem i głodem organizmu może uwalniać związki ketonowe i wywoływać zakwaszenie o charakterze metabolicznym. Zaobserwowano zwiększenie stężenia jonów potasu w osoczu, kreatyniny, reniny i aldosteronu, a zmiany te korelują z występowaniem skurczów mięśniowych. Znane są również przypadki ostrego zespołu nerkowego u ultramaratończyków będące potwierdzeniem ekstremalnego wysiłku, jakiemu poddawane są układy wyrównujące skutki pracy mięśniowej (*Kao i wsp. 2015*). Dodatkowo organizm musi poradzić sobie z eliminacją ciepła metabolicznego uruchamiając wszystkie możliwe procesy termoregulacyjne, zaburzając tym samym gospodarkę - wodno-elektrolitową, czego skutkiem będzie również narastające zmęczenie. Stopień zaburzeń oraz dynamika przywracania homeostazy po wysiłku zależą w głównej mierze od rodzaju i intensywności wysiłku, a także od osobniczych możliwości organizmu. W treningu wysokokwalifikowanych sportowców zmniejszenie zdolności wyrównywania zaburzeń metabolicznych i wodnoelektrolitowych po intensywnym wysiłku fizycznym decyduje o nadmiernym obciążeniu układu immunologicznego, oddechowego oraz sercowo-naczyniowego (*Hoffman i wsp. 2016*).

Kolejnym czynnikiem wpływającym na wynik będzie szybkość likwidowania skutków stresu oksydacyjnego wywołanego długotrwałym, intensywnym wysiłkiem (*Mickleborough i wsp. 2015*). W treningu biegaczy długodystansowych nadmierne obciążenie mięśni szkieletowych może być przyczyną mechanicznego uszkodzenia błon komórkowych, aktywacji

procesów zapalnych, zwiększonej bolesności mięśni z zespołem opóźnionej bolesności mięśni (DOMS, *ang. delayed onset muscle soreness*) oraz peroksydacji lipidów błonowych (Ramos-Campo i wsp. 2016). Głównym skutkiem stresu oksydacyjnego i cieplnego jest zaburzenie wielu procesów sygnalizacyjnych, transportowych i energetycznych w komórkach oraz zaburzenie przemian energetycznych w łańcuchu oddechowym (Mrakic-Spota i wsp. 2015).

Fizjologiczna odpowiedź na ekstremalny wysiłek to jednak jeszcze nie wszystko – składową sukcesu jest również wytrzymałość psychiczna, której komponentami są między innymi odporność na ból i zmęczenie (MacMahon i wsp. 2014). Otwarta jest dyskusja o genezie odczuwania zmęczenia. Pierwotna koncepcja zakładająca, że zmęczenie rozwija się podczas ćwiczeń o umiarkowanej i wysokiej intensywności, gdy zdolność układów do dostarczania tlenu ćwiczącym mięśniom spada została wzbogacona o dodatkowe modele powstawania zmęczenia: model wyczerpania energii, model rekrutacji mięśni, model biomechaniczny i psychologiczny. (Noakes, 2000). Interesujące są również badania percepcji bólu i występowania różnic międzyosobniczych w mechanizmach radzenia sobie z bólem. Mediatory hormonalne i neuroprzekaźniki takie jak tryptofan czy serotonina znane są z modulowania odczuwania bólu i wydają się być z kolei kluczowe w regulowaniu odczuwania zmęczenia obwodowego.

Uważa się, że uwarunkowania genetyczne w znacznym stopniu określają wynik końcowy wyścigu. W sporcie wyczynowym geny polimorficzne analizowane są jako markery genetyczne dla ustalenia predyspozycji do uprawiania sportu lub nawet konkretnej dyscypliny sportowej, zdolności do wykonywania określonego wysiłku w różnych populacjach i możliwości adaptacji do warunków zewnętrznych. W ostatnich latach szczególne zainteresowanie wzbudza polimorfizm dwóch genów ACE i ACTN3 oraz możliwość ich zastosowania w ocenie predyspozycji do wysiłków wytrzymałościowych, szybkościowych i/lub siłowych (Rizzo i wsp. 2003, Zawadzka i Michalik, 2016). Z drugiej strony jest jednak cały proces treningowy, który odpowiednio prowadzony może wpłynąć na poprawę wytrzymałości. Oczywiście czynniki odpowiedzialne za poprawę wydolności wysiłkowej wywołaną treningiem są niezwykle złożone i zależą od licznych cech fizjologicznych (tj. parametrów układu sercowo-naczyniowego, metabolicznego, nerwowego, oddechowego, termoregulacyjnego) i psychologicznych (nastrój, motywacja, percepcja zmęczenia). I choć niektóre z nich jak choćby VO_{2max} można zwiększyć tylko nieznacznie, to już jego procentowe wykorzystanie, bądź wspomnianą także ekonomikę biegu można poprawić na tyle, że predyspozycje genetyczne przestają odgrywać główną rolę. Opisywane zmiany adaptacyjne mają wpływ na nie tylko na efektywne wykonanie wysiłku biegowego, ale również skrócenie

okresu regeneracji (*Manley, 1999*). Procesy regeneracji organizmu można przyspieszyć poprzez różnorodne metody odnowy biologicznej. W treningu wytrzymałościowym istotne jest także wspomaganie zawodników w celu przeciwdziałania zmianom przeciążeniowym, jak również właściwa dieta i suplementacja m.in. składnikami odżywczymi, które pozytywnie wpływają na stabilizację procesów zapalnych i równowagę prooksydacyjno – antyoksydacyjną (*Tartibian i wsp. 2011*).

1. CZĘŚĆ PRZEGLĄDOWNA

1.1. Zmiany czynnościowe układu mięśniowego

Poprawa czynników fizjologicznych i psychologicznych w procesie treningu jest możliwa dzięki temu, że podejmowana aktywność fizyczna każdorazowo wyzwała w organizmie szereg zmian czynnościowych. W literaturze naukowej dostępne są liczne badania na temat wpływu biegów ultramaratońskich na zmiany funkcjonowania poszczególnych układów (*Sorichter i wsp. 1999; Waśkiewicz i wsp. 2012; Khodae i wsp. 2015; Hoffman, 2016*). Zmiany te wywoływane regularnie prowadzą do specyficznych adaptacji fizjologicznych, które ułatwiają zwiększenie zdolności wysiłkowych, tj. zdolności do utrzymania danego submaksymalnego obciążenia przez dłuższy okres czasu lub osiągnięcie wyższej średniej mocy wyjściowej na określonym dystansie lub w ustalonym czasie. Ogólnie, przystosowanie organizmu do wysiłku wytrzymałościowego dotyczy z jednej strony poprawy układów odpowiadających za dystrybucję substratów energetycznych i tlenu, a z drugiej strony odbiorców odpowiedzialnych za ich wykorzystanie. Poprawa zaopatrzenia pracujących tkanek w odpowiednie substraty jest przede wszystkim efektem usprawnienia czynności układu krążenia przez zwiększenie maksymalnej objętości minutowej serca i wzrost kapilaryzacji mięśni. Wykorzystanie i utylizacja tych substratów to z kolei efekt poprawy zdolności oddechowej mięśni: rośnie liczba i wielkość mitochondriów, a także zawartość mioglobiny w miocytach, co usprawnia transport tlenu do mitochondriów; zwiększa się aktywność enzymów uczestniczących w β -oksydacji kwasów tłuszczowych i zdolność miocytów do transportowania kwasów tłuszczowych (m.in. przez zmniejszenie stężenia malonylo-CoA (*Van Loon i wsp. 2001*)).

Biorąc pod uwagę obszar przeprowadzonych badań najbardziej istotne wydaje się właśnie omówienie zmian dotyczących adaptacji układu mięśniowego, a także relacji: obciążenie organizmu a zmęczenie.

Podstawowym czynnikiem odpowiadającym za zdolność mięśni do wykonywania wysiłku fizycznego w biegach długodystansowych jest regulacja przebiegu procesów metabolicznych w komórkach mięśniowych (*Booth i wsp. 1998*). W czasie długotrwałej (kilkugodzinnej) pracy mięśniowej zapotrzebowanie energetyczne mięśni prawie w zupełności pokrywane jest przez procesy tlenowe. Celem treningu wytrzymałościowego i adaptacji mięśniowej jest uzyskanie wysokiego poziomu przemian tlenowych jak najwcześniej tak, aby stanowiły jak największą część przemian metabolicznych, zmniejszając tym samym pobór energii ze źródeł beztlenowych, mniej ekonomicznych dla organizmu. Udział wolnych kwasów tłuszczowych (WKT) w pokrywaniu zapotrzebowania energetycznego pracujących mięśni

zwiększa się proporcjonalnie do czasu trwania wysiłku. Po 3 godzinach pracy udział WKT w metabolizmie mięśni szkieletowych wynosi ok. 80%. Trening wytrzymałościowy zwiększa zużycie kwasów tłuszczowych przez mięśnie – tak zwany punkt skrzyżowania węglowodanów i tłuszczów (obciążenie przy którym głównym źródłem energii stają się węglowodany) przesunięty jest w stronę większych obciążeń. Przy takiej samej bezwzględnej intensywności wysiłku ludzie wytrenowani zużywają więcej substratów tłuszczowych, co umożliwia im zaoszczędzenie rezerw węglowodanowych. Trening powoduje szybszą mobilizację kwasów tłuszczowych i resyntezę triacylogliceroli po wysiłku, a także zwiększa aktywność enzymów transportujących wolne kwasy tłuszczowe do mitochondriów. Zmiany zdolności oksydacyjnej mięśni dotyczą również wzrostu aktywności kluczowych enzymów katalizujących procesy utleniania z równoczesnym wzrostem stężenia mitochondrialnego białka przy lepszej kontroli stanu kwasowo-zasadowego (Hawley, 2002). Warunkiem stałej produkcji energii jest udział węglowodanów, których dostępność istotnie obniża się po 60 minutach wysiłku. Wyczerpanie zasobów glikogenu z wątroby może doprowadzić do hipoglikemii wysiłkowej. Dla utrzymania prawidłowego stężenia glukozy we krwi w skutek treningu dochodzi do zwiększenia aktywności enzymów procesu glukoneogenezy i wytwarzania glukozy ze źródeł niewęglowodanowych (Cerny i Burton, 2001).

Równolegle do opisanych zmian metabolicznych komórki mięśnia przechodzą adaptację morfologiczną. Mięsień szkieletowy jest niejednorodną tkanką składającą się z trzech typów włókien mięśniowych. Typ I - włókna wolno kurczące się - tlenowe, odporne na zmęczenie, typ IIx – szybko kurczące się, glikolityczne, podatne na zmęczenie i „hybrydowy” typ IIa - włókna szybko kurczące się, tlenowo – glikolityczne, odporne na zmęczenie. Odporność na zmęczenie włókien typu I jest wynikiem mniejszej niż we włóknach typu II siły skurczu i szybkości skracania przy mniejszej liczbie miofibrili i średnicy włókien, a ich tlenowy metabolizm możliwy jest dzięki większej zawartości mioglobiny i mitochondriów, a także lepszej kapilaryzacji i większej zawartości triacylogliceroli. Zakłada się, iż najważniejszym czynnikiem determinującym funkcjonalność włókien mięśniowych jest proporcja różnych typów łańcuchów ciężkich miozyny (MHC, ang. *myosin heavy chain*) (Pandorf i wsp. 2009). Osoby z wyższą zawartością włókien szybko kurczliwych predysponowane są do wysiłków o charakterze siłowo - szybkościowym, natomiast osoby z przewagą włókien wolno kurczliwych, mogą osiągać rezultaty np. w biegach ultramaratońskich (Liu i wsp. 2012). W związku z przewagą procesów tlenowych w sportach wytrzymałościowych to właśnie udział włókien typu I w ogólnej masie ciała będzie przekładał się na wydolność mięśni.

Zawartość procentowa określonego typu włókien mięśniowych w mięśniach szkieletowych jest różnorodna w populacji i jest cechą uwarunkowaną genetycznie. Biorąc jednak pod uwagę wysoki stopień plastyczności mięśni szkieletowych u ludzi poddawanych wysiłkowi fizycznemu, prawdopodobne są zmiany ilościowe i jakościowe ciężkich łańcuchów miozyny, a w związku z tym funkcja skurczowa włókien wolno- i szybko kurczliwych wraz z treningiem ulega zmianom różnicowym (*Trappe i wsp. 2006*). Wykazano, że u osób nietreningujących stosunek włókien szybko kurczliwych (typu IIA i IIX) do wolno kurczliwych (typu I) wynosi 50 : 50. W populacji sportowej biegacze długodystansowi i średniodystansowi mają 60 - 70% włókien typu I, a wśród sportowców wybitnie wytrzymałościowych procent ten wynosi nawet 90 - 95%. W przeciwieństwie do tej grupy sportowców, sprinterzy charakteryzują się przewagą do 80% włókien typu IIA i IIX (*Wilson i wsp. 2012*).

Podstawowe adaptacje fenotypowe w obrębie komórek mięśniowych to wzrost objętości i zmiany budowy mitochondriów określane jako biogeneza mitochondrialna. Aby takie zmiany zaistniały musi dojść do modyfikacji w ekspresji genów DNA mitochondrialnego, a to – jak wykazano – ma miejsce podczas każdej czynności skurczowej mięśni (*Hood i wsp. 2006*). Istnieje jednak dużo wątpliwości dotyczących doboru obciążeń treningowych pod względem konwersji włókien mięśniowych. Nie wiadomo dokładnie jak reagują na trening określone grupy mięśniowe, nieznany jest również wpływ wieku na możliwe zmiany morfologiczne. W związku z tym brak jest optymalnych dla danej dyscypliny protokołów treningowych. Badacze są zgodni, że jeśli sportowcy wytrzymałościowi chcą zwiększyć odsetek wolno kurczliwych włókien skurczowych, powinni zaangażować się w protokoły treningowe charakteryzujące się dużą objętością i niską intensywnością oraz w treningi o dużej objętości z intensywnymi interwałami.

Poprzez poprawę metabolizmu tlenowego komórek mięśniowych i konwersję włókien mięśniowych zawodnik może zwiększyć zdolność oksydacyjną mięśni, ale nie bez ograniczeń. Udowodniono bowiem, że nawet przekroczenie obciążenia treningowego powyżej 5 - 6 tys. kcal/tydz. (80 - 95 km biegu tygodniowo) nie spowoduje dalszego wzrostu tego parametru.

Za dalszą poprawę wyników maratończyka będzie odpowiadać adaptacja „dostawców” tlenu. Oprócz wspomnianej już objętości minutowej, kluczowe będą zmiany dotyczące układu krwionośnego. U biegaczy długodystansowych ma miejsce wzrost objętości osocza (nawet o 20%, w zależności od intensywności wysiłku), zmniejszenie lepkości krwi, co ułatwia jej przepływ i wzrost zawartości hemoglobiny (do 16 i więcej g/100ml). Ma także miejsce zwiększona erytropoeza i przyspieszony rozpad erytrocytów - u osób zaadaptowanych do wysiłku średni czas życia krwinki spada z ok 120 do 70 dni. W efekcie daje to większą ilość młodych krwinek, które łatwiej oddają tlen niż starsze erytrocyty. Mimo, że powstawanie nowych krwinek jest procesem korzystnym, uszkodzenia mechaniczne erytrocytów przekładają się na gorszą dystrybucję tlenu. Dlatego coraz więcej uwagi badacze poświęcają czynnikom mogącym zwiększyć wytrzymałość mechaniczną czerwonych krwinek (Mairbäurl, 2013).

1.1.1. Zmęczenie w biegach długodystansowych

Zaproponowana przez National Heart Lung and Blood Institute USA w 1990 roku definicja zmęczenia to *„brak możliwości kontynuowania wysiłku fizycznego o wymaganym obciążeniu, która cofa się w czasie odnowy biologicznej”* (Enoka i Duchateau, 2008). Stanowi fizjologiczną reakcję organizmu opisywaną jako mechanizm obronny przed uszkodzeniem struktur mięśniowych. Nieco inną definicję zaproponowali Szyguła i Gawroński (w Jagier i wsp. 2013) podając, że zmęczenie można definiować jako *„przejściowy stan naruszenia wewnętrznej równowagi funkcjonalnej narządu lub ustroju w następstwie wykonywania pracy fizycznej. Im cięższy jest wysiłek tym bardziej zaburza się homeostaza. Zaburzenia te pojawiają się szybciej u osób niewytrenowanych oraz przy niesprzyjających warunkach termicznych otoczenia.”*

Charakterystycznymi objawami zmęczenia są: znużenie, senność, zawroty i bóle głowy, brak koncentracji, bóle mięśniowe, uczucie duszności (objawy subiektywne), a także zaburzenia napięcia mięśniowego, zaburzenia temperatury ciała, zmniejszenie siły skurczu, podwyższenie tzw. markerów zmęczenia, zaburzenia akcji serca, zaburzenia ciśnienia krwi, wymioty i zaburzenia trawienia (objawy obiektywne) (Gieremek i Dec, 2010).

Najbardziej tradycyjnym podziałem zmęczenia jest podział na zmęczenie lokalne i ogólnoustrojowe (Gieremek i Dec, 2010). W zmęczeniu lokalnym zachodzące zmiany obejmują głównie mięśnie zaangażowane w wysiłek fizyczny. Bardzo szybko dochodzi wówczas do wyczerpania zapasów wysokoenergetycznych, tj. ATP, fosfokreatyny i glikogenu

oraz do tzw. zakwaszenia wnętrza komórki mięśniowej. Zmęczenie objawia się wówczas przede wszystkim zmniejszeniem siły maksymalnej i mocy mięśni wykonujących czynność ruchową.

W literaturze można znaleźć również podział na zmęczenie obwodowe, którego charakterystyka odpowiada zmęczeniu lokalnemu oraz ośrodkowe, za które odpowiada układ nerwowy (Enoka i Duchateau, 2008). Podczas długotrwałych wysiłków fizycznych obserwuje się znaczne podniesienie poziomu serotoniny, dopaminy i noradrenaliny doprowadzające do szeregu niekorzystnych reakcji organizmu. Nazar i wsp. (w Jagier i wsp. 2013) obok neurotransmitterów jako drugi czynnik wpływający na stopień zmęczenia ośrodkowego wskazują częstotliwość stymulacji mięśni. Podczas wysiłków o wysokiej częstotliwości (ang: *hight frequency fatigue*), gdzie w krótkim czasie wyzwalana jest siła maksymalna (podnoszenie ciężarów, sprint), utrata siły jest szybka, ale i stosunkowo szybki jest jej powrót do wartości wyjściowych. Natomiast w zmęczeniu wywołanym przez stymulację niskiej częstotliwości (ang: *low frequency fatigue*), utrata siły następuje wolno i utrzymuje się długo. Nie do końca są natomiast poznane dokładne mechanizmy hamowania ze strony układu centralnego sterowania.

Zmęczenie dzieli się również w zależności od rodzaju wysiłku, który je wywołuje (Enoka i Duchateau, 2008). Typ pierwszy to zmęczenie powstałe w wyniku wysiłku krótkotrwałego o dużej intensywności. Za przyczynę tego rodzaju zmęczenia uważa się akumulację mleczanu i związany z tym spadek pH spowodowany przez jony H^+ (Brich i wsp. 2012). Gromadzenie jonów wodorowych hamuje również proces glikolizy i glikogenolizy. Oprócz mleczanu czynnikiem wywołującym tego typu zmęczenie jest wzrost poziomu nieorganicznego fosforanu (Pi), zmniejszenie stężenia fosfokreatyny (PCR), zaburzenie prędkości resyntezy ATP (zaburzenie działania pompy sodowo-potasowej) i w efekcie dysfunkcja w procesach polaryzacji i depolaryzacji błony komórkowej miocytu (zaburzenia skurczów mięśnia), a także wzrost wytwarzania i gromadzenie się amoniaku w następstwie przyspieszenia cyklu nukleotydów purynowych (Bednarek i wsp. 2013).

Drugi typ zmęczenia to zmęczenie powstałe w wyniku wysiłku długotrwałego, którego przyczyną są przede wszystkim: hipoglikemia, wyczerpanie glikogenu mięśniowego oraz zaburzenie równowagi elektrolitowej w wyniku odwodnienia. Wystąpienie i stopień odczuwania zmęczenia zależy więc w dużym stopniu od zachowań żywieniowych i nawodnienia organizmu. Aktualne badania jednoznacznie wskazują, że przy zastosowaniu diety wysokowęglowodanowej przed wysiłkiem, następuje wydłużenie czasu wykonywania wysiłku fizycznego długotrwałego do odmowy (Brich i wsp. 2012). Podobnie jest ze stężeniem

glukozy we krwi. Osoby, u których podczas wysiłku poziom glukozy we krwi spadał poniżej 3 mmol/l i podawane miały 100 gramów glukozy i mogły kontynuować wysiłek o dalsze 40 minut. Również odwodnienie jest tym czynnikiem, który nie budzi żadnych wątpliwości wśród badaczy zajmujących się procesami zmęczenia mięśniowego. Ubytek wody rzędu 2% masy ciała zmniejsza radykalnie moc aerobową organizmu, a 3% stanowi tzw. punkt krytyczny mocy (Jagier i wsp. 2013). Z kolei wzrost temperatury wewnętrznej organizmu tylko o 1°C powoduje przyspieszenie akcji serca o 9 uderzeń na minutę i spadek objętości wyrzutowej serca o około 11 ml. Podwyższenie temperatury o 3°C zaburza już funkcje psychiczne organizmu i pojawiają się pierwsze symptomy hipertermii: bóle i zawroty głowy, splątanie, skurcze mięśni, zaburzenia koordynacji ruchów.

Ze względu na czas trwania wysiłku zmęczenie w biegach ultramaratońskich na pewno należy zakwalifikować do typu drugiego, choć ze względu na często występujące podbiegi można także zaobserwować cechy zmęczenia jakie mają miejsce w wysiłku interwałowym. Dużo danych dotyczących m.in. zmęczenia w biegu ultramaratońskim dostarczyły badania Marrtina i wsp. (2010) przeprowadzone na biegaczach biorących udział w 24 godzinnym biegu terenowym. Jako główną przyczynę zmęczenia nerwowo-mięśniowego zmęczenia badacze wskazują zmęczenie centralne objawiające się dużymi deficytami w aktywacji centralnej mięśni (szczególnie prostowników kolana) minimalizując znaczenie zmęczenia obwodowego.

Wysiłek fizyczny z jakim mają do czynienia ultramaratończycy często przekracza fizjologiczne możliwości mięśni do przenoszenia mechanicznych obciążeń przez co może skutkować urazami. Do istotnych należą wyniki badań, według których szacuje się, że liczba zawodników wysokiego wyczynu, którzy ulegają poważnym dysfunkcjom narządu ruchu waha się w granicach 30 - 70%, przy czym w latach olimpijskich osiąga górne granice (Conn i wsp. 2003). Zmiany pourazowe mięśni szkieletowych stanowią około 10 - 55% wszystkich obrażeń w sporcie. Pewne kontrowersje na temat rozpoznania i leczenia częściowych uszkodzeń mięśni, ścięgien i aparatu więzadłowo-torebkowego mogą być przyczyną nieodpowiedniego leczenia i przedwczesnego zakończenia kariery sportowej. Klasyfikacja uszkodzeń mięśni obejmuje trzystopniowy podział, w zależności od ilości uszkodzonych włókien mięśniowych. Urazy bezpośrednie charakteryzują się uszkodzeniem najgłębiej położonych włókien mięśniowych, przylegających do tkanki kostnej. W fazie skurczu ekscentrycznego lub w sytuacji nagłej zmiany przyspieszeń może dochodzić do urazu pośredniego, w którym uszkodzenie obejmuje włókna mięśniowe o najmniejszej rozciągliwości (Sorichter i wsp. 1999; Proske i Morgan, 2001). Szczególnie podatni na ten rodzaj uszkodzeń są sportowcy, u których nieleczone kontuzje spowodowały powstawanie blizn łącznotkankowych, a także zmniejszenie

elastyczności i tolerancji obciążeń mięśni szkieletowych. Poważnym problemem wśród sportowców są urazy ostre mięśni oraz nawracające, które wynikają z rozpoczynania treningów przed pełnym wyleczeniem obrażeń, co jest przyczyną obniżenia wytrzymałości, siły mięśniowej oraz stabilności układu kostno-stawowego (*Jarvinen i wsp. 2013*). W przypadku biegów ultramaratońskich najczęstsze kontuzje dotyczą ścięgna Achillesa (tendinopatia) i przeciążeń stawu rzepkowo-udowego (*Lopes i wsp. 2012*). Interesujące jest to w jaki sposób zawodnicy radzą sobie z pojawiającym się podczas biegu zmęczeniem i jak chronią się przed przeciążeniami. Zmienia się częstotliwość kroków i mechanika biegu, m.in. przez inne ustawienie kątowe w stawie skokowym w momencie kontaktu z podłożem. W stanie zmęczenia ultramaratończycy używają kompensacyjnych regulacji prowadzących do bardziej płaskiego lądowania stopy, minimalizując obciążenie układu mięśniowo-szkieletowego (*Giandolini i wsp. 2016*).

Ultramaratony, czy biegi długodystansowe rozgrywane są w różnorodnych warunkach atmosferycznych, środowiskowych, klimatycznych, co przy pokonywaniu kilkudziesięciu kilometrów podczas biegu przyczynia się do mechanicznego uszkodzenia błon komórkowych prowadzących do pojawienia się zwiększonej bolesności mięśniowej z zespołem opóźnionej bolesności mięśni (DOMS, *ang. delayed onset muscle soreness*) (*Khodae i Ansari, 2012; Mickleborough i wsp. 2015*). Dowodem znacznego obciążenia organizmu jest uwalnianie specyficznych markerów uszkodzenia mięśni do krwi oraz nasilenia reakcji zapalanej. Do powszechnie wykorzystywanych markerów uszkodzenia mięśni szkieletowych należy troponina (Tn) (*Sorichter i wsp. 1997*), mioglobina (Mb), kinaza keratynowa (CK) (*Hoffman i wsp. 2016*). Wykazano zwiększenie stężenia markerów uszkodzenia mięśni szkieletowych oraz wyższe stężenie kortyzolu we krwi po biegu na dystansie 161 km. Dowiedziono, że wyższy poziom sportowy wpływa na większe uwalnianie markerów uszkodzenia mięśni (*Khodae i wsp. 2015*). Szczególne znaczenie w diagnostyce uszkodzenia mięśni szkieletowych ma wzrost aktywności CK, która zależna jest od liczby zaangażowanych jednostek motorycznych i rodzaju wykonywanego wysiłku. Poziom aktywności CK szacuje się w spoczynku na poniżej 190 U/l i może wzrastać powyżej 2000 U/l po intensywnym wysiłku u niewytrenowanych (*Latham i wsp. 2008*).

Zespoły bólowe wywołane wysiłkiem fizycznym dzieli się je na te występujące w trakcie wysiłku (zespoły ostre) i zespoły opóźnione, tzw. DOMS - narastające w przeciągu od kilku do 72 godzin od czasu wysiłku. Biorąc pod uwagę maksymalną optymalizację procesu treningowego, w tym do minimum skrócenie okresów przerw między treningami, to właśnie te ostatnie budzą duże zainteresowanie badaczy zajmujących się regeneracją i odnową

biologiczną w sporcie. W dostępnych publikacjach sprecyzowanych zostało kilka hipotez dotyczących powstawania DOMS: teoria powysiłkowego spazmu mięśni, inaczej opisywana jako „metaboliczna”, teoria mechanicznych mikrouszkodzeń mięśnia, teoria mikrouszkodzeń tkanki łącznej i teoria zapalna (*Hume i wsp. 2004; Brown i wsp. 1999; Nosaka i Clarkson, 1996*).

Interesującą, choć dosyć złożoną koncepcją jest teoria powysiłkowego spazmu mięśni, czyli bezwiednego nadmiernego skurczu mięśni poprzecznie prążkowanych. Przedstawiana jest jako skutek zaburzeń rozkurczowych poszczególnych nici w sarkomerze, które z kolei odruchowo zaburzają funkcję miofibryli, powodując ich odruchowy skurcz. Spazm sarkomerów powoduje patologiczne uwalnianie jonów wapnia, a utrzymujące się stałe niedokrwienie, a tym samym niedotlenienie doprowadza do „kryzysu energetycznego”. Taki stan skutkuje z kolei uwalnianiem interleukiny 1 β , serotoniny i adrenaliny w bezpośrednim obszarze spazmatycznego mięśnia, które wiążąc się ze specyficznymi receptorami zakończeń nerwowych zwanych „purynergicznymi” i „waniloidowymi”, które wyzwalają reakcję bólową charakterystyczną dla DOMS (*Hume i wsp. 2004*).

Teoria „łącznotkankowa” związana jest z określeniem zależności pomiędzy zwiększonymi znacząco markerami uszkodzenia kolagenu jakimi są hydroksyprolina (HP) i hydroksylizyna (HL). Kolagen strukturalnie związany jest z tkanką ścięgnisto-mięśniową. Stanowi on 25% białka w organizmie człowieka i więcej niż 50% białka w tkance blizny. Zawartość podtypów kolagenu różni się w poszczególnych tkankach. *Brown i wsp. (1999)* odnotowali wzrost wspomnianych markerów w moczu i krwi po wysiłku, potwierdzając uszkodzenie tkanki łącznej, jednak wyniki te nie zostały potwierdzone w innych badaniach. Ponadto, zmiany poziomu tychże aminokwasów mogą być pochodną zarówno degradacji jak i wzmożonej syntezy kolagenu i zależą od rodzaju wysiłku fizycznego oraz wielkości obciążanej grupy mięśniowej (*Nosaka i Clarkson, 1996*).

Teoria zapalna jest w aktualnym stanie badań jedną z najczęściej analizowanych. Wyniki biopsji mięśni w badaniach nad DOMS wskazują na bardzo podobne uszkodzenia włókien mięśniowych, jak w przypadku chorób mięśniowych na tle zapalnym. Jednak pomimo zgodności różnych autorów co do podwyższonej powysiłkowej obecności komórek odpowiedzialnych za inicjację procesu zapalnego (neutrofilii, makrofagów) istnieją rozbieżności co do czynnika, który ten wzrost wywołał. Niektórzy badacze uważają, że wzrost stężenia tych komórek powinien być raczej uznany za odpowiedź adaptacyjną i naprawczą organizmu, a nie za czynniki wywołujące niszczenie komórek (*Komulainen i wsp. 1999*).

Hipotezą najszerszej opisaną jest teoria mikrouszkodzeń mięśnia. W związku ze znaczącymi obciążeniami może dochodzić do uszkodzeń błon komórkowych, które obserwowane są w biopsji oraz we wzroście aktywności kinazy kreatynowej (CK) jako markera uszkodzeń tkanek. Panuje zgodność, co do rodzaju skurczu, który w sposób szczególny wpływa na większy wzrost CK - są to skurcze ekscentryczne, które stanowią istotny czynnik wywołujący zespół opóźnionego bólu mięśniowego (*Cheung i wsp. 2003, Kanda i wsp. 2013*). Aktywność ekscentryczna mięśni polega na kontrolowaniu długości brzośca w momencie napięcia mięśnia. Większość mięśni kończyny dolnej pracuje ekscentrycznie podczas normalnego chodu - dzięki temu dochodzi do wyhamowania działania ciężaru ciała i zmniejszenia wstrząsu podczas fazy kontaktu pięty z podłożem. Podczas biegu, kiedy dodatkowo mamy do czynienia z fazą lotu, mięśnie podejmują zwiększony wysiłek aby ograniczyć działanie siły ciężkości, a kiedy doda się do tego ujemną różnicę wysokości między krokami (bieg w dół), mięśnie antygrawitacyjne takie jak prostowniki stawu kolanowego, mięśnie przedniego i tylnego przedziału piszczeli, a także prostowniki stawu biodrowego w skutek takiego obciążenia mogą ulec uszkodzeniom (*Eston i wsp. 1995*). Bieg w dół i towarzyszące mu skurcze ekscentryczne to tzw. ćwiczenia indukujące uszkodzenia mięśni (EIMD, ang. *exercise-induced muscle damage*), a ich znakiem rozpoznawczym jest właśnie DOMS (*Clarkson i Hubal, 2002*).

Większość autorów dostępnej literatury, to zwolennicy tzw. teorii integracyjnej, uznającej zjawisko DOMS jako efekt złożonej kaskady reakcji. Uwzględnia się wówczas kilka zintegrowanych mechanizmów takich jak:

- wysoki udział skurczów ekscentrycznych zwiększających naprężenia włókien mięśniowych, które doprowadzają do szeregu niekorzystnych reakcji w tkance mięśniowej,
- wysoka aktywność mięśni przyczyniająca się do zakłóceń strukturalnych białek w sarkomerach, a w szczególności do osłabienia linii Z,
- uszkodzenie tkanek, które zaburza dokomórkowy transport jonów wapnia, co w konsekwencji wpływa na oddychanie komórkowe, zwiększa aktywność enzymów proteolitycznych i tonus mięśniowy,
- powstanie stanu zapalnego obserwowanego poprzez obecność markerów uszkodzenia zarówno tkanki mięśniowej jak i łącznej – proces ten drażni zakończenia nerwowe, determinuje tworzenie się wysięków w miejscu uszkodzenia, dając tym samym pełny obraz DOMS (*Margaritelis i wsp. 2015*).

1.2. Stres oksydacyjny i odpowiedź układu immunologicznego na wysiłek fizyczny

Stres oksydacyjny to stan zakłóconej równowagi między produktami ubocznymi przemian metabolicznych, czyli reaktywnymi formami tlenu (ROS, *ang. Reactive Oxygen Species*), a zdolnością usuwania ich z organizmu. Reaktywne formy tlenu to cząsteczki chemiczne stale obecne w niewielkim stężeniu w prawidłowo funkcjonujących komórkach – są wytwarzane i zużywane w wyniku procesów metabolicznych. W komórkach ROS, w stężeniach fizjologicznych, spełniają rolę cząsteczek sygnałowych uczestniczących w uruchamianiu odpowiedzi zapalnej i fagocytozy oraz biorą udział jako przekaźniki informacji w procesach starzenia komórek i naprawy tkanek (Çimen, 2008; Sies, 2015). Wysiłki ultrawytrzymałościowe powodują wzmożoną produkcję ROS ((Mrakic-Spota i wsp. 2015), głównie poprzez zwiększenie przepływu elektronów przez enzymy łańcucha oddechowego, czemu towarzyszy ucieczka elektronów na tlen cząsteczkowy i powstanie anionorodników ponadtlenkowych (Finaud i wsp. 2006). Do czynników nasilających produkcję ROS bezpośrednio podczas biegów ultramaratońskich, jak również w okresie restytucji zalicza się między innymi: zwiększoną konsumpcję tlenu przez mitochondrialny łańcuch oddechowy, rosnące stężenie krążących we krwi katecholamin, które ulegają autooksydacji; skurcze ekscentryczne pracujących mięśni z mikrourazami i towarzyszącym im stanem zapalnym oraz wywołane zwiększonym wysiłkiem związanym z podbiegami powtarzane epizody niedokrwienno - reperfuzyjne w mięśniach szkieletowych (Powers i Jackson, 2008; Sies, 2015). W konsekwencji następuje wzrost stresu oksydacyjnego, który może potencjalnie przekroczyć możliwości antyoksydacyjne organizmu (Radak i wsp. 2008; Powers i wsp. 2016).

Zachowanie równowagi pomiędzy wytwarzaniem i usuwaniem ROS jest konieczne do utrzymania prawidłowego stanu czynnościowego komórek. W tym celu komórki są wyposażone w enzymatyczne i nieenzymatyczne mechanizmy obronne. Na enzymatyczny mechanizm antyoksydacyjny składa się szereg enzymów, które bezpośrednio usuwają anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$) i nadtlenek wodoru (H_2O_2), zapobiegając reakcji ROS ze składnikami komórki. Dodatkowo, enzymy te reagując z $O_2^{\cdot-}$ i H_2O_2 nie dopuszczając do powstawania rodnika hydroksylowego (OH^{\cdot}), najbardziej niebezpiecznej reaktywnej formy tlenu.

Do najważniejszych antyoksydantów enzymatycznych komórki należą: dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), katalaza (CAT), peroksydaza glutationowa (GPx) i reduktaza glutationowa (GR). W warunkach fizjologicznych enzymy te współdziałają ze sobą,

a inaktywacja któregokolwiek z nich powoduje osłabienie obrony antyoksydacyjnej organizmu (Çimen, 2008).

Pierwszą linię obrony enzymatycznej zapewnia SOD zlokalizowana w cytoplazmie (SOD miedziowo-cynkowa) i w mitochondriach (SOD manganowa), której rola polega na szybkiej redukcji anionorodników ponadtlenkowych do H_2O_2 , powodując obniżenie jego stężenia do poziomu poniżej 10-11M (Abreu i Cabelli, 2010).

Nadtlenek wodoru następnie rozkładany jest przez dwa enzymy czerwonokrwinkowe: CAT i GPx do wody. Ponadto GPx posiada dodatkową zdolność do rozkładu wodorotlenków lipidowych powstałych po rozpadzie lipidów błonowych, korzystając przy tym z produktów dostarczanych przez zredukowany glutation (GSH). Ważną rolę w odtwarzaniu GSH pełni GR, enzym czerwonokrwinkowy, który jako źródło elektronów wykorzystuje NADPH (Lushchak, 2012).

Obrona antyoksydacyjna w „drugiej linii” polega na zmiataniu” wolnych rodników i przerywaniu reakcji łańcuchowej. Do antyoksydantów nieenzymatycznych należą między innymi witaminy A, C i E, kwas moczowy, melatonina, transferyna, haptoglobina i glutation (GSH)(Mirończuk-Chodakowska i wsp. 2018). Glutation występuje w postaci zredukowanej lub utlenionej (GSSG) i bierze udział w reakcjach redoks jako związek redukujący. Ponadto działa jako kofaktor wielu enzymów antyoksydacyjnych (Lushchak, 2012).

Zaburzenie stanu redoks komórki może mieć bardzo poważne konsekwencje dla komórki. Utlenienie białek prowadzi do zmian strukturalnych i funkcjonalnych aminokwasów: dochodzi do niepożądanych reakcji tworzenia makrokompleksów pomiędzy łańcuchami bocznymi białek, a także do fragmentacji cząsteczek białkowych. Ponadto białka enzymatyczne stają się bardziej wrażliwe na proteolizę i wahania temperatury, zmienia się również ich aktywność katalityczna (Cecarini i wsp. 2007).

Innym procesem biologicznym, związanym z działaniem ROS jest peroksydacja lipidów błonowych. Proces utleniania nienasyconych kwasów tłuszczowych obecnych w lipidach, w wyniku którego powstają nadtlenki tych związków zapewnia ciągły dopływ wolnych rodników, kaskadowo inicjując kolejne reakcje peroksydacji. Peroksydacji ulegają przede wszystkim reszty wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, wchodzące w skład fosfolipidów, które są podstawowym składnikiem budulcowym błon biologicznych (Ayala i wsp. 2014). Peroksydacja lipidów jest procesem wieloetapowym, który nieodłącznie towarzyszy reakcjom aerobowym metabolizmu. Ich końcowe produkty mogą zmieniać właściwości fizyczne błon komórkowych. Do fosfolipidów znajdujących się wewnątrz podwójnej warstwy lipidowej, wprowadzone zostają polarne grupy nadtlenkowe, ketonowe,

aldehydowe lub hydroksylowe. powodując to obniżenie hydrofobowości lipidowego wnętrza błon komórkowych, a także zaburzenia asymetrii lipidowej błon (Ayala i wsp. 2014). W wyniku peroksydacji lipidów dochodzi również do zahamowania aktywności enzymów błonowych i białek transportujących. Ostatecznie reakcje peroksydacji mogą spowodować zaburzenia integralności błon komórkowych (El-Beltagi i Mohamed, 2013) i ucieczkę enzymów komórkowych do krwiobiegu. Poziom oksydacyjnych zmian w strukturze błon komórek mięśniowych odzwierciedla pojawienie się charakterystycznych związków markerowych we krwi takich: jak CK, LDH, AspAT, AlAT czy Mb (Nosaka i wsp. 2002; Close i wsp. 2004; Margaritelis i wsp. 2015).

Systemu obrony antyoksydacyjnej człowieka w warunkach obciążenia wysiłkiem fizycznym budzi wśród badaczy sportowych ogromne zainteresowanie. Badanie na zawodnikach 24-godzinne ultramaratonu wykazało, że takie obciążenie rzeczywiście wiąże się z licznymi zaburzeniami procesów fizjologicznych, w tym indukcją uszkodzenia mięśni, odpowiedzi immunologicznej i zwiększonym stanem zapalnym. Jednak pomimo „przeciążenia tlenowego” wskaźniki biochemiczne związane ze stresem oksydacyjnym nie kumulowały się znacząco podczas zawodów, prawdopodobnie ze względu na korzystne zmiany adaptacyjne, które podtrzymał system obrony antyoksydacyjnej (Benedetti i wsp. 2018).

W literaturze pojawiło się wiele prac dotyczących tych zagadnień w różnych dyscyplinach sportowych (Dékány i wsp. 2006; Hadžović-Džuvo i wsp. 2014). Panuje zgodność co do tego, że aktywność enzymów antyoksydacyjnych obniża się, szczególnie w warunkach znacznego zaburzenia równowagi redoks pod wpływem jednorazowego wysiłku (Vollaard i wsp. 2005; Powers i wsp. 2011(a i b); Powers i wsp. 2016), natomiast umiarkowany stres oksydacyjny indukowany regularną aktywnością fizyczną stymuluje ekspresję enzymów antyoksydacyjnych (Gomez-Cabrera i wsp. 2008; Azizbegi i wsp. 2014). Wyniki sugerują, że regularnie prowadzony trening wywołuje zmiany adaptacyjne, które wraz a odpowiednią suplementacją mogą znacznie ograniczyć szkodliwe skutki wzmożonego stresu oksydacyjnego.

Intensywny wysiłek fizyczny i stres oksydacyjny będący jego konsekwencją, prowadzą do aktywacji układu immunologicznego, którego podstawową funkcją jest utrzymanie homeostazy w organizmie człowieka przez rozpoznawanie i niszczenie patogenów oraz naprawę i eliminowanie komórek uszkodzonych lub nieprawidłowych.

Odpowiedź immunologiczna oparta jest na dwóch różnych, ale powiązanych ze sobą mechanizmach: nieswoistym (wrodzonym) i swoistym (nabytym). Odporność swoistą charakteryzuje wcześniejszy kontakt z czynnikami patogennymi. Wyróżnia się wysoką

precyzyjnością rozpoznawania antygenów, a jej najważniejszymi komponentami są limfocyty T, limfocyty B, komórki prezentujące antygen, cytokiny i przeciwciała. W zależności od tego, które komórki biorą udział w odpowiedzi immunologicznej, wyróżnia się odpowiedź swoistą typu komórkowego i typu humoralnego. W odpowiedzi typu komórkowego uczestniczą subpopulacje limfocytów T, które reagując bezpośrednio ze swoistym antygenem wydzielają cytokiny, co umożliwia włączenie makrofagów i granulocytów do odpowiedzi immunologicznej. Drugim ważnym składnikiem odpowiedzi immunologicznej typu komórkowego jest działanie cytotoksyczne limfocytu T (*McComb i wsp. 2013*). W odpowiedzi typu humoralnego uczestniczą wolne przeciwciała (immunoglobuliny) uwalniane przez limfocyty B i plazmocyty. Na każdym etapie odpowiedzi immunologicznej istnieje ścisła kooperacja i uzupełnianie się mechanizmów nieswoistych i swoistych.

Ważną rolę w modelowaniu odpowiedzi immunologicznej odgrywają cytokiny - rodzina białek (w większości glikoprotein) regulujących proliferację i różnicowanie komórek. Oddziałują one na wiele komórek stając się mediatorami reakcji zapalnych i immunologicznych. W skład tej grupy związków wchodzi m.in. interleukiny (IL-1), interferony (INF) i czynniki martwicy nowotworów (TNF- α). Cytokiny regulują odpowiedź organizmu gospodarza przez zainicjowanie całej kaskady procesów zapalnych, co mobilizuje składniki swoistego układu immunologicznego, umożliwia komunikowanie się z ośrodkowym układem nerwowym i zwiększa proliferację wybranych populacji komórek niezbędnych dla wzmocnienia odpowiedzi i uruchomienia procesów naprawczych.

Niezależnie bowiem od przyczyny i rodzaju uszkodzenia mięśnia, mechanizmy naprawcze mają podobny przebieg: uszkodzone włókna mięśniowe ulegają degeneracji, której towarzyszy proces zapalny, po czym następuje regeneracja. Wytwarzane w uszkodzonych komórkach mięśniowych chemokiny (cytokiny chemotaktyczne) wywierają bezpośredni wpływ na miogenezę, a także działają parakrynnie poprzez rekrutację komórek odpornościowych. Wykazano, że zasadnicze znaczenie dla narastania odpowiedzi zapalnej podczas regeneracji mięśni ma receptor chemokiny CC 2 (CCR2) (*Yahiaoui wsp. 2008*). Inne cytokiny prozapalne takie jak IL-1, IL-6, IL-8, bezpośrednio lub pośrednio aktywują zarówno oś podwzgórze – przysadka - nadnercza jak i układ współczulny. Aktywacja tych układów wywiera efekt przeciwzapalny; zostają wydzielane cytokiny IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, co ogranicza dalszą produkcję cytokin prozapalnych. W efekcie, w prawidłowo funkcjonującym organizmie, istnieje równowaga pomiędzy reakcjami o charakterze pro- i przeciwzapalnym (*Shaikh, 2011; McComb i wsp. 2013*).

Sprawność układu immunologicznego zawodników ma znaczący wpływ na wyniki sportowe. Jak się okazuje, sportowcy uczestniczący w ciężkim treningu fizycznym, zwłaszcza o charakterze wytrzymałościowym, są dużo bardziej podatni na infekcje, co wynika z osłabienia czynności systemu immunologicznego organizmu (*Pederesen i Hoffman-Getz, 2000; Brolinson i Elliott, 2007; Walsh i wsp. 2011*). Zjawisko to najbardziej jest nasilone podczas pierwszych kilku godzin po zakończeniu wyczerpującego wysiłku i spowodowane jest przede wszystkim obniżeniem się poziomu IgA, której zadaniem jest ochrona górnych dróg oddechowych przed infekcją (*Hejazi i Hosseini, 2012*), a także jest zwiększeniem pod wpływem wysiłku fizycznego we krwi hormonów odpowiedzialnych za reakcje stresowe, głównie kortyzolu (*Kaye, 2005*). Zaobserwowano przy tym, że podatność na infekcje zależy od wielkości obciążeń treningowych (głównie objętości treningu) - umiarkowane wysiłki fizyczne wpływają na ogół korzystnie na układ immunologiczny, a tym samym na poziom odporności organizmu (*Brolinson i Elliott, 2007*). Z kolei pojedynczy epizod intensywnego treningu wiąże się ze wzrostem wydzielania białek ostrej fazy oraz cytokin o działaniu prozapalnym (*Petersen i Pedersen, 2006*). Dotyczy to głównie IL-6, której stężenie narasta najszybciej z wszystkich cytokin i osiąga najwyższe wartości, dlatego w diagnostyce sportowej została uznana za interleukinę wskaźnikową aktywowanych wysiłkiem fizycznym procesów zapalnych (*Reihmane i Dela, 2014*).

1.3. Rola suplementacji w profilaktyce zmęczenia

Zawodnicy systematycznie trenujący biegi długodystansowe powszechnie stosują suplementy diety, które pomagają w procesie treningowym i regeneracji. Rodzaj treningu i suplementów muszą być ze sobą ściśle skorelowane w celu uzyskania optymalnej adaptacji wysiłkowej i powysiłkowej organizmu (*Hawley i wsp. 2006*). W sportach wytrzymałościowych największą rolę odgrywa optymalna dieta węglowodanowa zapewniająca wysokie stężenie glikogenu mięśniowego i odpowiednie nawodnienie organizmu zarówno przed jak i podczas aktywności. Zawodnik powinien mieć opracowaną zindywidualizowaną strategię żywieniową, która ma na celu dostarczanie węglowodanów do pracujących mięśni w tempie zależnym od intensywności i czasu trwania wysiłku. Wyższe spożycie węglowodanów może skutkować lepszą wydajnością, a spożycie „przenośnych” węglowodanów pozwala na szybkie tempo utleniania węglowodanów co przekłada się na doskonałą wydajność (*Jeukendrup, 2011*). Z kolei spożycie węglowodanów z niewielką ilością białka we wczesnej fazie po treningu wytrzymałościowym zwiększa resyntezę glikogenu mięśniowego (*Millard-Stafford i wsp. 2008*). Odpowiednim nawodnieniem przed podejmowanym wysiłkiem fizycznym sportowcy wytrzymałościowi powinni próbować zminimalizować dehydratację ograniczając utratę masy

ciała w skutek pocenia się. Utrata wody w procesach termoregulacji zaburza równowagę wodno-elektrolitową i zwiększa zapotrzebowanie organizmu zawodnika na mikro- i makroelementy, głównie magnez i potas (*Petrović i wsp. 2016*).

Popularne wśród sportowców są suplementy podnoszące wydajność organizmu zawierające L-karnitynę i kreatynę, a także przyspieszające procesy regeneracji zawierające aminokwasy (BCAA, *ang. Branched-Chain Amino Acids*) (*Blomstrand i wsp. 2006*). Interesujący jest kierunek, w którym zmierza suplementacja: coraz chętniej zawodnicy sięgają po środki całkowicie naturalne, tzw. nutraceutyki, których działanie jest jednak potwierdzone naukowo. Obok wspomnianych suplementów wpływających na możliwości wysiłkowe zawodnika można znaleźć nieprzetwarzaną w żaden sposób kofeinę. Średnia poprawa wydajności po spożyciu kofeiny wynosi $3,2 \pm 4,3\%$, a efekt działania można zwiększyć przez powstrzymanie się od jej spożycia przez co najmniej 7 dni (*Ganio i wsp. 2009*). Przykładem naturalnej suplementacji wpływającej z kolei na proces regeneracji może być tzw. cierpka wiśnia, której duża popularność w ostatnich latach wśród sportowców wytrzymałościowych spowodowana jest udokumentowaną skutecznością. Bogata w właściwości przeciwutleniające i przeciwzapalne, ma działanie ochronne zmniejszające odczucia bólowe po intensywnym wysiłku (*Kuehl i wsp. 2010*). Wśród środków bazujących na naturalnym pochodzeniu stałe zainteresowanie badaczy dotyczy witamin (B₁₂, E, C) (*Nieman i wsp. 2002*) oraz naturalnych antyoksydantów (*Mastaloudis i wsp. 2004, Jówko i wsp. 2015, Sadowska-Krępa i wsp. 2017*).

Dużą grupę naturalnych suplementów stanowią preparaty wzbogacone w nienasycone kwasy tłuszczowe (PUFA). Wielonienasycone kwasy tłuszczowe (WNKT) zawierają w swojej budowie podwójne wiązanie pomiędzy atomami węgla (dwa lub więcej). Ich dwie podstawowe rodziny to grupa kwasów omega-3 i omega-6 w zależności od położenia ostatniego wiązania. Główne WNKT to kwas α -linolenowy (ALA) oraz kwas linolowy (LA). Organizm człowieka nie potrafi ich syntetyzować i muszą być dostarczane egzogennie. Oba typy kwasów są zawarte w zróżnicowanej diecie, jednak w zachodnich cywilizacjach przeważają kwasy typu omega-6. W żywieniu proporcje kwasów omega-3 do omega-6 wynoszą od 1:20 do 1:10, tymczasem za optymalne uważa się 1:2, a nawet 1:1 (*Wertz, 2009*). W powszechnie stosowanej diecie produkty roślinne są głównym źródłem WNKT z tym, że zawartość kwasów omega-6 w porównaniu do kwasów z grupy omega-3 w produktach najczęściej spożywanych jest znacznie większa, co uniemożliwia utrzymanie ich we właściwych proporcjach (*Simopoulos, 2002*). Źródłem naturalnie występujących kwasów omega-6 są oleje roślinne, kukurydza, słonecznik i soja, natomiast kwasów omega-3 są głównie tłuste ryby morskie, takie jak łosoś czy dorsz, a także nasiona lnu. Utrzymanie w diecie właściwej proporcji kwasów omega 6 :

omega 3 ma duże znaczenie ponieważ kwasy omega-6 stymulują produkcję czynników zapalnych, z kolei kwasy omega-3 poprzez wypieranie z komórek kwasów omega-6, hamują reakcję zapalną.

Urazy powstałe podczas ćwiczeń o wysokiej intensywności prowadzą do stanu zapalnego, który nasila się ze względu na zwiększoną ilość kwasów tłuszczowych omega-6 w dietach zachodnich. Można temu przeciwdziałać przyjmując kwas eikozapentaenowy (EPA) i kwas dokozaheksaenowy (DHA) (Simopoulos, 2007). W dotychczasowych badaniach potwierdzono również ich skuteczność na zwiększenie tolerancji wysiłków wytrzymałościowych (Żebrowska i wsp. 2015; Mickleborough i wsp. 2015). Częściowo tłumaczone jest to zmianami czynnościowymi krwinek czerwonych: kwasy omega-3 wbudowując się w warstwę lipidową błony erytrocytów wzmacniają ją i poprawiają elastyczność krwinek (Ho i wsp. 199; Anderson i wsp. 2002). Zmiana ta może wpłynąć na efektywność dostarczania tlenu do tkanek, tym samym zwiększać wydolność tlenową (VO₂max). Konieczne są kolejne badania z zastosowaniem standaryzowanych testów dających jednoznaczne wyniki.

Dowodzono, że regularne spożywanie kwasów omega-3 wpływa na zdolności regeneracyjne (Farzaneh – Far i wsp. 2010) i przeciwzapalne. Wzbogacenie diety osób nietreningujących w kwasy DHA i EPA w porównaniu z grupą placebo, istotnie zmniejszyła poziom markerów uszkodzenia mięśni: TNF- α oraz Tnl, CK – MM, Mb oraz korzystnie wpłynęła na maksymalną siłę skurczu (MVC) po wysiłku biegowym (Mickleborough i wsp. 2015). Wyniki badań mogą wskazywać, że podawanie PUFA może zmniejszyć ryzyko występowania DOMS oraz działać protekcyjnie na funkcję śródbłonna naczyniowego u dobrze wytrenowanych zawodników dyscyplin wytrzymałościowych (Żebrowska i wsp. 2015).

Wśród preparatów zawierających nienasycone kwasy tłuszczowe duże zainteresowanie w ostatnich latach dotyczy kompleksu lipidowego PSCO – 524 (Lyprinol[®]) (Doggrell, 2009). Suplement ten jest naturalnym preparatem zawierającym unikalny morski kompleks lipidowy (PSCO-524) uzyskiwanym na drodze ekstrakcji i stabilizacji z nowozelandzkiego małża zielonego (*Perna canaliculus* L.) o potwierdzonych korzyściach zdrowotnych. Udokumentowano korzystny wpływ stosowania suplementu w prewencji uszkodzenia mięśni po wysiłku fizycznym z ekscentrycznym komponentem pracy osób nietreningujących (Mickleborough i wsp. 2015), poprawę wydolności układu sercowo-naczyniowego oraz zmniejszenie ryzyka niewydolności oddechowej i astmy oskrzelowej (Emed i wsp. 2004).

Niewiele jednak jest doniesień na temat znaczenia suplementacji kompleksem lipidowym PSCO – 524 na stan obrony antyoksydacyjnej oraz procesy regeneracji mięśni

szkieletowych po wysiłku fizycznym, a także zawartość kwasów tłuszczowych we krwi ocenianych na podstawie wskaźnika HS-Omega-3 Index[®]. Test Omega umożliwia zbadanie wartości poszczególnych grup kwasów tłuszczowych, wraz z proporcjami między nimi. Wydaje się, że osiągnięcie należnych wartości Indeksu Omega-3 we krwi jako efekt suplementacji wymienionym preparatem wzbogaconym w n-3 PUFA pozwoliłoby na uzyskanie optymalnych możliwości wysiłkowych wyczynowych sportowców oraz skrócenie okresu regeneracji po intensywnym wysiłku fizycznym.

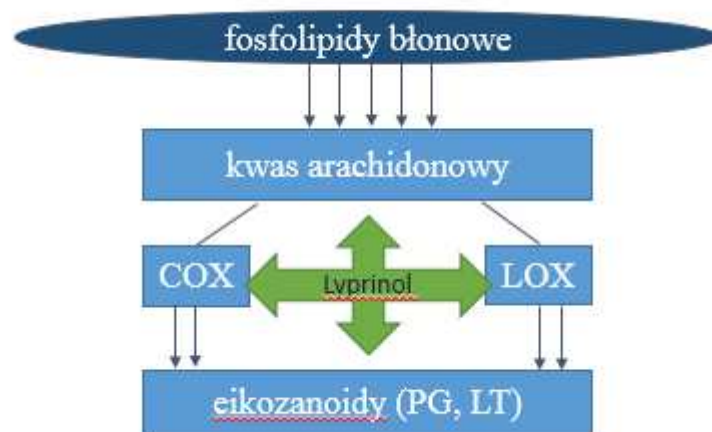
1.3.1. Działanie Lyprinolu

Lyprinol jest mieszaniną pięciu głównych klas lipidów, w tym estrów steroli, trójglicerydów, wolnych kwasów tłuszczowych, steroli i polarnych lipidów. Wykazano, że zawiera do 91 kwasów tłuszczowych, a kwas dokozaheksaenowy (DHA) i eikozapentaenowy (EPA) stanowią 84% zawartości wszystkich wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Najbardziej istotne działanie preparatu jest właśnie wynikiem zawartości tych dwóch długołańcuchowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych omega-3, obecnych w proporcjach 13% EPA, 21% DHA i około 30% cholesterolu (*Murphy i wsp. 2002*).

Morfologiczne uszkodzenia mięśnia powodują odpowiedź zapalną uaktywniając makrofagi i neutrofile, a ich akumulacja w miejscu uszkodzenia zwiększa produkcję leukotrienów, prostaglandyn i bradykinin. Te łącząc się z receptorami błonowymi blokują transport jonów wapnia, a ich nagły wzrost wewnątrz komórki stymuluje produkcję kwasu arachidonowego, powodując dalszy wzrost poziomu prostaglandyn i leukotrienów (*Murase i wsp. 2010*). Działanie prostaglandyn i bradykinin w uszkodzonym mięśniu polega na drażnieniu zakończeń nerwowych typu III i IV przez nocycceptory (receptory bólowe), co daje odczucia bólowe. Z kolei leukotrieny powodują gromadzenie się neutrofilii, a uwalnianie w procesie fagocytozy wolne rodniki mogą powodować dalsze zniszczenia komórek mięśniowych (*Connolly i wsp. 2003*).

Lyprinol ze względu na zawartość EPA i DHA, które są konkurencyjnymi substratami dla enzymu cyklooksygenazy (COX, synteza prostaglandyn) i enzymu lipooksygenazy (synteza leukotrienów) zmniejsza poziom zapalnych prostaglandyn (PGE) i leukotrienów (LT) (*McPhee i wsp. 2007*). Lyprinol zawiera pewne nowe PUFA ω -3 takie jak: kwas 5,9,12,15-oktodecatetraekoenowy, kwas 5,9,12,16-non-deka-trenowy, kwas 7,11,14,17-eikozatetraenowy i kwas 5,9,12,15,18-heneikapententaenowy (*Treschow i wsp. 2007*). Kwasy te z uwagi na podobną strukturę do kwasu arachidonowego (kwas 5,8,11,14 - eikozatrakowy), będącym

prekursorem czynników zapalnych (prostaglandyn i leukotrienów) prawdopodobnie mogą modulować udział tych czynników w reakcji przeciwzapalnej. Wykazano, że w ludzkich monocytach produkcja PGE₂ z kwasu arachidonowego była hamowana przez Lyprinol przy IC₅₀ 1,2 µg/ml (*Whitehouse i wsp. 1997*). W przypadku ludzkich leukocytów wielojądrzastych w obecności kwasu arachidonowego, Lyprinol (100 µg/ml) ogranicza tworzenie się LT B₄ i 5-HETE (produktów ze szlaków lipooksygenazowych) (*Whitehouse i wsp. 1997*) z ludzkich neutrofilii stymulowanych kwasem arachidonowym (*Treschow i wsp. 2007*). Lyprinol ma również bezpośrednią zdolność do hamowania enzymów COX (COX-1 i COX-2) związanym z nadmiernym stanem zapalnym (*McPhee i wsp. 2007*). Oprócz opisanego działania Lyprinol zmniejsza zdolność lipopolisacharydu (LPS) do stymulacji czynnika martwicy nowotworów alfa (TNF- α) u zwierząt doświadczalnych w modelu zapalenia stawów oraz obniża stężenie TNF- α i hamuje wytwarzanie IL-1, IL-2 i IL-6 w izolowanych preparatach komórkowych (*Mani i wsp. 2006*).



Ryc.1. Wpływ Lyprinolu na modulowanie reakcji zapalnej (*aut. własne*)

2. CEL PRACY

Biegi długodystansowe stają się coraz bardziej popularną dyscypliną sportu, zwiększa się liczba osób startujących w maratonach i ultramaratonach. Podejmowane są także badania, których celem jest poznanie reakcji fizjologicznych oraz czynników ryzyka problemów zdrowotnych u osób biorących udział w biegach długodystansowych. Potwierdzenie hipotezy o pozytywnym wpływie kompleksu lipidowego PSCO-524 na tolerancję wysiłkową i przyspieszenie procesu regeneracji układu mięśniowego u maratończyków i ultramaratończyków pozwoliłoby na wykorzystanie w/w suplementu w prewencji zmęczenia u sportowców trenujących biegi długodystansowe.

Głównym celem pracy jest ocena wpływu suplementacji kompleksem lipidowym PSCO-524 (*Perna canaliculus L.*) na zawartość kwasów tłuszczowych w krwinkach czerwonych, równowagę prooksydacyjno-antyoksydacyjną krwi, poziom markerów uszkodzenia mięśni i mediatorów stanu zapalnego, a także na poprawę stopnia regeneracji mięśni szkieletowych u biegaczy długodystansowych.

Sformułowano następujące **pytania badawcze**:

- 2.1. Czy suplementacja kompleksem lipidowym (*Perna canaliculus L.*) wpływa na zawartość kwasów tłuszczowych w krwinkach czerwonych u biegaczy długodystansowych?
- 2.2. Czy zastosowana w badaniach suplementacja wpływa na równowagę prooksydacyjno-antyoksydacyjną, poziom markerów uszkodzenia mięśni i mediatorów stanu zapalnego u biegaczy długodystansowych po wysiłku biegowym z przewagą skurczów ekscentrycznych?
- 2.3. Czy suplementacja zastosowanym kompleksem lipidowym wpływa na poprawę regeneracji mięśni szkieletowych tj. obniżenie bólu i napięcia mięśniowego u biegaczy długodystansowych po zastosowanym wysiłku biegowym?

W związku z powyższym przyjęto następujące **hipotezy badawcze**:

- 2.4. Suplementacja kompleksem lipidowym (*Perna canaliculus L.*) wpływa na podwyższenie zawartości kwasów tłuszczowych w krwinkach czerwonych u biegaczy długodystansowych.

2.5. Suplementacja kompleksem lipidowym wpływa na zwiększenie zdolności antyoksydacyjnej krwi, obniżenie poziomu markerów uszkodzenia mięśni i mediatorów stanu zapalnego.

2.6. Suplementacja kompleksem lipidowym wpływa na poprawę regeneracji mięśni szkieletowych tj. obniżenie bólu i napięcia mięśniowego u biegaczy długodystansowych po zastosowanym wysiłku biegowym.

3. MATERIAŁ I METODY BADAŃ

3.1. Charakterystyka badanych

Badania zostały przeprowadzone u 24 zawodników trenujących biegi długodystansowe i startujących w biegach ultramaratońskich takich jak: *Bieg Kukuczki* (21 km; 42,195 km), *Silesia Marathon*, *Bieg Rzeźnika* (88 km), *Beskidy Ultra Trial* (60 km; 90 km; 120 km), *Chudy Wawrzyniec* (50 km, 80 km), *Zamieć* (24 h) czy *Dolnośląski Festiwal Biegów Górskich*. Cały proces badawczy odbył się w okresie przygotowawczym rocznego cyklu treningowego (podczas trwania badania biegacze nie brali udziału w żadnych zawodach biegowych). Tygodniowe obciążenia treningowe badanych wynosiło średnio pomiędzy 60 – 110 km, w tym przynajmniej 3 treningi w tygodniu o dystansie minimum 15 km.

Biegacze zostali poinformowani o celu i protokole badań, który uprzednio został zaakceptowany przez lokalną Komisję Bioetyczną ds. Badań Naukowych przy Akademii Wychowania Fizycznego im. J. Kukuczki w Katowicach. Wszyscy badani wyrazili zgodę na udział w projekcie badawczym i spełnili określone kryteria doboru (Tabela 1).

Tabela 1. Kryteria doboru zawodników do badania

Kryteria włączenia do badania	Kryteria wyłączenia z badania
<ul style="list-style-type: none"> ▪ dobrowolna zgoda na badanie ▪ staż treningu sportowego ukierunkowanego na długie dystanse minimum 3 lata ▪ osoby pełnoletnie, ▪ dobry stan zdrowia i brak przeciwwskazań do wykonania próby wysiłkowej ▪ nie przyjmowanie przez badanych suplementów o właściwościach antyoksydacyjnych i/lub leków przeciwzapalnych w okresie poprzedzającym (co najmniej 2 miesiące) badania oraz w czasie ich realizacji 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ przeciwwskazania zdrowotne (zaświadczenie lekarskie) ▪ niedyspozycyjność w dniu badania (kontuzja, zdiagnozowany stan zapalny) ▪ przyjmowanie przez badanych suplementów o właściwościach antyoksydacyjnych i/lub leków przeciwzapalnych w okresie poprzedzającym (co najmniej 2 miesiące) badania oraz w czasie ich realizacji ▪ stosowanie środków niedozwolonych zgodnie z aktualną listą środków dopingujących, ▪ staż treningowy mniejszy niż 3 lata

Badani zostali poproszeni o wypełnienie kwestionariusza na temat swojej przeszłości treningowej, dotychczasowych nawyków żywieniowych i suplementacji. Na tej podstawie zostało określone dzienne spożycie podstawowych składników pokarmowych, witamin oraz kwasów tłuszczowych nasyconych i nienasyconych. Najważniejsze informacje umieszczone zostały w tabeli poniżej.

Tabela 2. Średnie dzienne spożycie energii, tłuszczów, węglowodanów, białka i kwasów tłuszczowych w grupie placebo i suplementowanej

Zmienna	PL (n=12)	SUPL (n=12)
Energia [kcal]	2393,66 ± 425,05	2176,33 ± 219,27
B [%]	24,14 ± 7,10	22,17 ± 5,18
T [%]	32,43 ± 9,04	31,41 ± 9,00
W [%]	43,43 ± 11,07	45,13 ± 8,03
SFA [g]	37,82 ± 13,64	36,17 ± 12,20
MUFA [g]	32,48 ± 14,48	27,81 ± 8,04
18:2 [g]	8,01 ± 4,04	8,39 ± 3,10
18:3 [g]	1,36 ± 0,95	0,91 ± 0,29
PUFA [g]	10,36 ± 4,47	10,29 ± 2,93

B: białka, T: tłuszcze, W: węglowodany, SFA (*ang. saturated fatty acid*): kwasy tłuszczowe nasycone, MUFA (*ang. monounsaturated fatty acid*): kwasy tłuszczowe jednonienasycone, 18:2 kwas linolowy (LA), 18:3 kwas α -linolenowy (ALA), PUFA (*ang. polyunsaturated fatty acid*): kwasy tłuszczowe wielonienasycone

Następnie wartości zostały zmodyfikowane przy pomocy programu dietetycznego (Dietus, B.U.I. InFit. Warszawa, Polska), który na podstawie danych żywieniowych zebranych z dwóch dni roboczych i jednego wolnego szacuje należne spożycie składników pokarmowych. Określone ilości są na bieżąco monitorowane po wpisaniu spożytego posiłku. Dane z całego tygodnia kontrolowano podczas obowiązkowych cotygodniowych wizyt w laboratorium. Dodatkowym zaleceniem było nie stosowanie kofeiny, alkoholu i innych używek. Otrzymane wskazania dietetyczne badani mieli stosować przez trzy tygodnie przed rozpoczęciem badań i kontynuować w okresie realizowania projektu.

Wszystkich badanych scharakteryzowano w oparciu o wiek, parametry budowy somatycznej i podstawowe parametry wydolnościowe. Wyniki badań antropometrycznych i wydolnościowych po losowym przydziale do grup przedstawiono w tabeli poniżej (Tabela 3).

Tabela 3. Charakterystyka somatyczna badanych

Zmienna	PL n=12	SUPL n=12
Wiek	35,92 ± 5,58	35,36 ± 7,77
Masa ciała [kg]	178,18 ± 7,05	180,97 ± 5,43
Wysokość ciała [cm]	75,28 ± 8,94	77,12 ± 6,29
BMI	23,68 ± 2,21	23,58 ± 2,06
FAT%	10,24 ± 3,79	12,32 ± 3,91
FAT [kg]	13,50 ± 4,59	9,55 ± 3,19
SMM [kg]	36,90 ± 4,66	39,54 ± 4,27
TBW [l]	47,48 ± 5,65	48,39 ± 5,42
HR rest	81,00 ± 8,56	76,70 ± 12,70
HR max	185,33 ± 9,86	178,34 ± 8,85
VO ₂ rest	5,53 ± 1,28	5,86 ± 0,80
VO ₂ peak	59,75 ± 8,32	57,35 ± 7,66

BMI (*ang. body mass index*): wskaźnik masy ciała, FAT% (*ang. percent of body fat*): procentowa zawartość tłuszczu, SMM (*ang. skeletal muscle mass*): masa mięśniowa, TBW (*ang. total body water*): całkowita zawartość wody, HR rest (*ang. heart rate rest*): tętno spoczynkowe, HR max (*ang. heart rate maximum*): tętno maksymalne, VO₂rest (*ang. rest oxygen uptake*): spoczynkowy pobór tlenu, VO₂peak (*ang. peak oxygen uptake*): maksymalny pobór tlenu

3.2. Protokół badań

Wszystkie badania zostały przeprowadzone przez wykwalifikowany personel w Pracowni Biochemii oraz Wielofunkcyjnej Pracowni Badań Czynnościowych Akademii Wychowania Fizycznego w Katowicach w ramach grantu „Rozwój Sportu Akademickiego” (decyzja 0029/RS4/2016/54). Eksperyment przebiegał w trzech etapach. W pierwszym etapie wszyscy badani zostali poddani podstawowym pomiarom antropometrycznym z oceną masy i składu ciała w oparciu o metodę bioimpedancji elektrycznej, badaniu tętna spoczynkowego i spoczynkowego poboru tlenu (analiza gazometryczna). Następnie wykonany został pomiar wydolności aerobowej w metodzie bezpośredniej wyznaczania maksymalnego poboru tlenu (VO₂ max) z wyznaczeniem progu przemian anaerobowych (LAT, *ang. Lactic Acid Treshold*) i uzyskaniem maksymalnego tętna wysiłkowego.

W drugim etapie wszyscy badani wykonali biegowy wysiłek o charakterze ekscentrycznym przy użyciu testu opracowanego przez A.R. Young Company, Indianapolis (Sorichter i wsp. 1997; Sorichter i Mair, 1998). Przed rozpoczęciem wysiłku wykonano następujące oznaczenia: indeks kwasów tłuszczowych we krwi (HS-Omega-3 Index[®]), wskaźniki równowagi prooksydacyjno – antyoksydacyjnej, markery uszkodzenia mięśni szkieletowych i mediatorów stanu zapalnego, a także przeprowadzono ocenę bólu mięśniowego i napięcia mięśni kończyn dolnych (wyniki spoczynkowe). Badania zostały powtórzone bezpośrednio po zakończeniu testu, po godzinnym i 24 godzinnym odpoczynku.

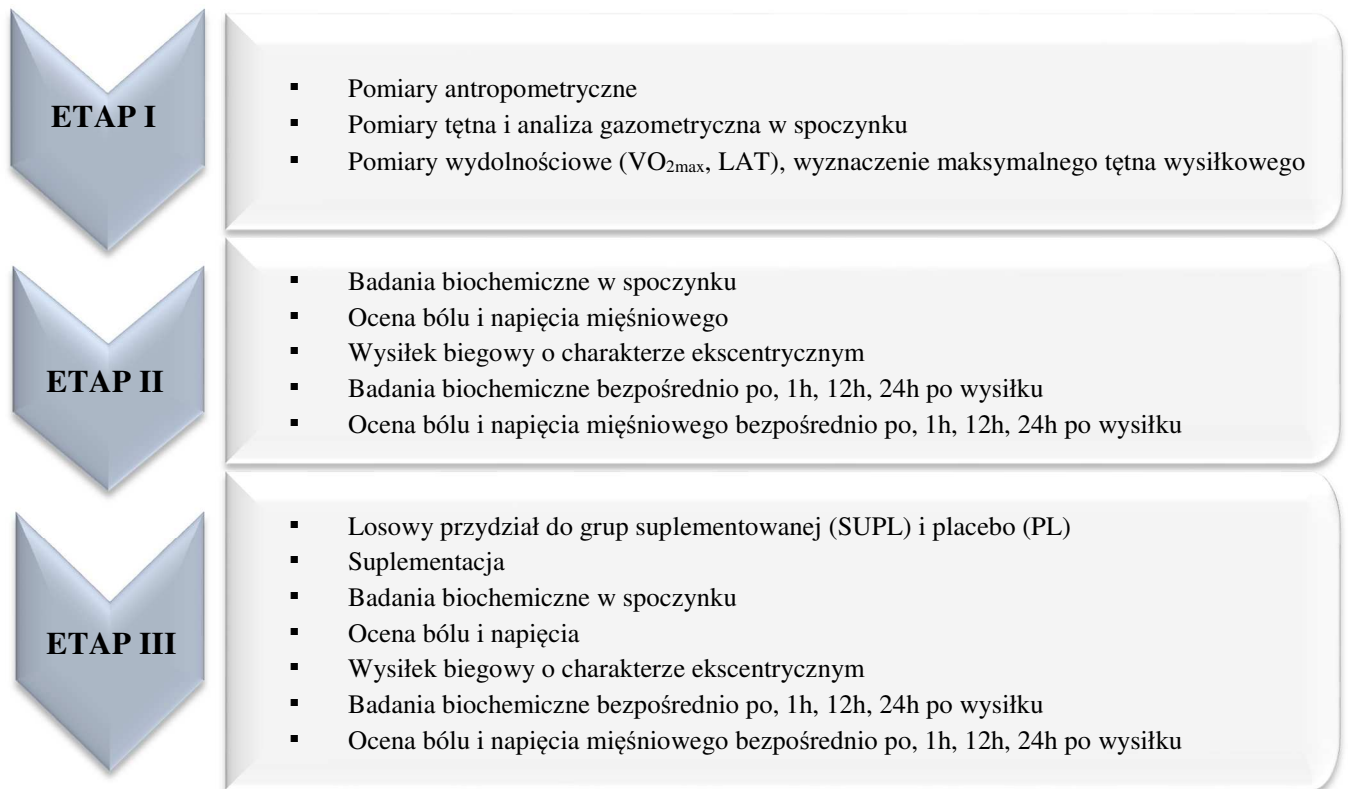
Pierwszy i drugi etap były oddzielone od siebie co najmniej siedmiodniową przerwą w celu całkowitego wyeliminowania skutków wykonanego wysiłku.

W etapie trzecim zawodnicy zostali losowo podzieleni na dwie grupy:

- a) suplementowaną kompleksem lipidowym PSCO-524 (*Perna canaliculus* L.; grupa suplementowana, SUPL)
- b) kontrolną, przyjmującą *placebo* (grupa placebo, PL)

Zawodnicy przez trzy kolejne tygodnie przyjmowali zalecone dawki suplementu diety. Po zakończeniu suplementacji powtórzono test wysiłkowy o charakterze ekscentrycznym z oznaczeniem wskaźników biochemicznych, bólu mięśniowego i napięcia mięśniowego zgodnie z protokołem drugiego etapu badań.

Podczas trwania całego badania biegaczom polecono utrzymywać treningi o podobnej intensywności jak ta określona w wywiadzie, z zaleconą 72 godzinną przerwą od aktywności sportowej przed każdym z testów. Badani zobowiązali się również do niestosowania żadnych zabiegów fizykalnych mogących wpłynąć na bolesność i napięcie mięśniowe.



Ryc.2. Przebieg badań

3.3. Badania antropometryczne i ocena składu ciała

Zakwalifikowani do projektu badawczego biegacze zostali poddani podstawowym pomiarom antropometrycznym (wiek, płeć, wysokość ciała, masa ciała) z rozszerzoną oceną składu ciała przy pomocy urządzenia InBody Data Management System, wykorzystującym w badaniu zjawisko bioimpedancji elektrycznej (in. impedancja bioelektryczna). Z uwagi na nieinwazyjność, łatwość obsługi i powtarzalność wyników jest to coraz szerzej stosowana metoda. Badanie polega na zmierzeniu oporu elektrycznego złożonego z rezystancji i reaktancji tkanek, przez które przepuszczany jest prąd elektryczny o niskim natężeniu (1 mA). Ciało nie jest jednolitą strukturą, a jego oporność i pojemność elektryczna w zależności od rodzaju tkanki są zmienne. Szczególne znaczenie w przewodzeniu prądu ma woda wraz z rozpuszczonymi w niej elektrolitami i tkanka tłuszczowa. Przy zastosowaniu odpowiednich przekształceń matematycznych można uzyskać w badaniu rzetelną informację dotyczącą ilości i rozłożenia poszczególnych tkanek w organizmie (*Lewitt i wsp. 2007*).

3.4. Badania fizjologiczne

Do pomiaru maksymalnego poboru tlenu VO_{2max} zastosowano standardową progresywną próbę biegową na bieżni ruchomej z analizą gazometryczną (próba ergospirometryczna; HP Cosmos, Niemcy). Wszyscy ochotnicy wykonywali test wysiłkowy o stopniowo wzrastającej intensywności (ExProg), zaczynając od obciążenia rozgrzewkowego wynoszącego 6 km/h o 0% nachyleniu bieżni (pierwsze 3 minuty), następnie zwiększając prędkość o 2 km/h co trzy minuty, aż do uzyskania prędkości 12 km/h. Wówczas intensywność jest zwiększana przez zwiększanie nachylenia o 2,5%. Sześć minut przed rozpoczęciem testu i podczas jego kolejnych etapów badany oddycha przez maskę, a powietrze wydechane jest do analizatora gazów. Znając skład powietrza atmosferycznego wylicza się (automatycznie) ile tlenu ubyło z powietrza wdychanego w stosunku do wydechane (współczynnik oddechowy, RER). W czasie wysiłku o narastającym obciążeniu zużycie tlenu przez ustrój wzrasta proporcjonalnie do obciążenia aż do pewnej wartości, a następnie stabilizuje się (plateau) pomimo zwiększania obciążenia i oznacza to, że organizm osiągnął maksymalną zdolność do poboru tlenu (VO_{2max}) wyrażoną w mililitrach/kilogram masy ciała/minutę. Inne kryteria zakończenia testu (osiągnięcia VO_{2max}) to odmowa osoby podejmującej próbę (brak możliwości kontynuowania biegu), osiągnięcie współczynnika oddechowego lub przekroczenie 1,15 ($RER \geq 1,1$), a także mleczan na poziomie równym bądź przekraczającym 8,0 mmol/L. Na podstawie analizy gazów został również określony próg mleczanowy (LAT, *ang. lactic acid threshold*), a do wyznaczenia maksymalnego tętna użyto urządzenia typu sporttester (PE-3000 Sport-Tester, Polar Inc., Kempele Finland).

Celem przeprowadzonego testu było określenie wydolności fizycznej badanych na podstawie maksymalnego poboru tlenu (VO_{2max}), reakcji fizjologicznej na zadany wysiłek oraz wyznaczenie progu przemian anaerobowych. Na podstawie osiągniętych wyników zostało wyznaczone dla każdego badanego obciążenie w wysiłku o ekscentrycznym charakterze pracy (ExE).

3.5. Analiza biochemiczna

Przygotowanie materiału biologicznego do oznaczeń biochemicznych

Analizy biochemiczne przeprowadzono w certyfikowanej Pracowni Biochemii w Akademii Wychowania Fizycznego w Katowicach. Materiałem biologicznym przeznaczonym do badań biochemicznych była krew pobierana z żyły odłokciowej przed

rozpoczęciem testu wysiłkowego, bezpośrednio po jego zakończeniu, w 1 godzinie i w 24 godzinie restytucji powysiłkowej oraz krew kapilaryzowana przed i po zastosowanej suplementacji.

Część (około 500 μ l) świeżo pobranej próby krwi umieszczono w heparynizowanej probówce Eppendorfa w celu wykonania oznaczeń stężenia hemoglobiny, wartości hematokrytu i zredukowanego glutationu (GSH). Około 2,5 ml krwi pobranej do probówki z antykoagulantem wirowano w wirówce Sigma 2-16K przez 10 minut z szybkością 1000 x g przez 10 minut, aby oddzielić osocze. Pozostałą po wirowaniu masę erytrocytarną 3-krotnie płukano zimnym roztworem soli fizjologicznej (4°C) i każdorazowo odwirowywano. Przemyte erytrocyty, zamrożono w temperaturze -80°C i przechowywano do momentu wykonania oznaczeń aktywności enzymów antyoksydacyjnych. Do osobnych probówek, z aktywatorem wykrzepiania, pobierano krew w celu uzyskania surowicy. Po wykrzepieniu krwi oddzielono surowicę od skrzepu przez odwirowanie w temperaturze 4°C przy 1000 x g. Otrzymaną surowicę, podobnie jak erytrocyty i osocze, zamrożono i przechowywano w temperaturze -80°C do czasu wykonania oznaczeń biochemicznych.

Oznaczenia biochemiczne

A. wskaźniki antyoksydacyjne:

- aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD, E.C. 1.15.1.1) oznaczano w hemolizatach erytrocytów metodą spektrofotometryczną przy pomocy zestawu diagnostycznego RANSOD firmy Randox (UK, nr kat. SD 125),
- aktywność peroksydazy glutationowej (GPx, E.C. 1.11.1.9) oznaczano w hemolizatach erytrocytów metodą spektrofotometryczną korzystając z zestawu diagnostycznego RANSEL firmy Randox (UK, nr kat. RS 505),
- aktywność katalazy (CAT, E.C.1.11.1.6) oznaczano w hemolizatach krwinek czerwonych metodą Aebiego (1984),
- stężenie zredukowanego glutationu (GSH) powstałego w wyniku reakcji enzymatycznej oznaczano w hemolizacie krwi metodą Beutlera i wsp. (1963),

B. wskaźniki stresu oksydacyjnego:

- stężenie produktów peroksydacji lipidów z kwasem tiobarbiturowym (MDA) oznaczano w osoczu metodą Buegea i Austa (1978),

C. markery uszkodzeń błon komórek mięśniowych:

- aktywność kinazy kreatynowej (CK, E.C. 2.7.3.2) oznaczano w osoczu krwi metodą kinetyczną korzystając z zestawu diagnostycznego firmy Analco (UK, nr kat. CK 522)
- aktywność dehydrogenazy mleczanowej (LDH, E.C. 1.1.1.27) w osoczu krwi oznaczano metodą kinetyczną przy użyciu zestawu diagnostycznego firmy Analco (UK, nr kat. LD 401),
- stężenie troponiny (TnT) w surowicy krwi metodą immunoenzymatyczną przy użyciu zestawu LSBio (USA)
- stężenie mioglobiny (Mb) w surowicy krwi metodą immunoenzymatyczną przy użyciu zestawu Cloud-Clone Corporation (USA)

D. wskaźniki stanu zapalnego

- TNF- α (TNF- α -EASIA KAP1751) w surowicy krwi metodą immunoenzymatyczną, przy użyciu zestawu diagnostycznego firmy DIASOURCE, Belgia
- IL-6 HS w surowicy krwi metodą immunoenzymatyczną ELISA, przy użyciu zestawu diagnostycznego DIACLONE, Francja

E. Indeks kwasów tłuszczowych

- HS-Omega-3 Index[®] z oznaczeniem proporcji nasyconych kwasów tłuszczowych do jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (NKT/JNKT), indeksu tłuszczów TRANS i stosunku kwasu eikozapentaenowego do arachidonowego (AA/EPA) z wykorzystaniem zestawu diagnostycznego Centro Diagnostico Delta, Sannio Tech, Włochy.

Tabela 4. Czulość metody, błąd wewnątrzoznaczeniowy, międzyoznaczeniowy (CV%) oraz zakres wartości referencyjnych badanych wskaźników biochemicznych

Wskaźnik	Czulość metody	CV%		Zakres wartości referencyjnych	
		Wewnątrz serii (%)	Między seriami (%)		
SOD, U/gHb	-	4,11	6,51	1102	1601
CAT, U/gHb	-	-	-	-	-
GPx, U/gHb	75 U/gHb	5,83	4,03	27,5	73,6
CK, U/l	21,7 U/l	1,93	3,63	24	195
LDH, U/L	55,1 U/l	2,83	3,38	230	460
IL-6, pg/ml	0,32 pg/ml	5,1	4,7	-	-
TNF- α , pg/ml	2,3 pg/ml	6,0	7,1	-	-
TnT, μ g/l	5,9 pg/ml	< 10	< 12	-	-
Mb, ng/ml	0,056 ng/ml	< 10	< 12	0	50

3.6. Test wysiłkowy o charakterze pracy ekscentrycznej

Na podstawie osiągniętego w próbie wysiłkowej maksymalnego poboru tlenu i wyznaczenia progu anaerobowego zostało wyznaczone indywidualnie dla każdego zawodnika obciążenie dla testu biegowego o charakterze pracy ekscentrycznej. Bieg odbywał się na bieżni nachylonej pod kątem minus 16 procent przez 30 minut. Prędkość bieżni została ustawiona tak, aby tętno badanego korespondowało z tętnem uzyskanym przy 70% swojego VO_{2maks} – jeżeli podczas biegu tętno zaczynało wzrastać, przy niezmiennym stopniu nachylenia zmniejszano prędkość bieżni aż do uzyskania określonej wartości tętna. Formuła testu powstała na podstawie zmodyfikowanego protokołu badań A.R. Young Company, Indianapolis (*Sorichter i wsp. 1997; Sorichter i Mair, 1998*), który z powodzeniem był już stosowany w celu wywołania uszkodzeń tkanki mięśniowej spowodowanej zbieganiem w dół w stopniu mogącym indukować objawy DOMS (*Eston i wsp. 1995, Sorichter i wsp. 1999*).

3.7. Ocena progu bólu

Do oceny progu bólu został wykorzystany algizymetr (Medical Industries, USA 2011). Wyznaczanie uciskowego progu bólu (PT, ang: *Pain Threshold*) wydaje się być próbą obiektywnej kontroli tzw. spoczynkowego progu bólu i jego zmian po wysiłku ekscentrycznym.

Procedura badania polegała na wykonaniu u każdego badanego trzykrotnej próbie uciskowej sondą (parametry wynosiły: $r = 4$ mm) w określony obszar tkanki (mięśnia czworogłowego i dwugłowego) prawej i lewej kończyny dolnej wywołując siły kompresyjne. Siła nacisku była odczytywana w momencie zasygnalizowania przez badanego bodźca określanego jako nieprzyjemnego. Wartość siły (kG lub N) na wyświetlaczu podawana jest w sposób cyfrowy z dokładnością do dwóch miejsc po przecinku i wyliczana jako średnia z 3 pomiarów. W przypadku zbyt dużego odchylenia w mierzonej wartości, urządzenie sygnalizowało konieczność powtórzenia próby. Badając bardzo bolesny mięsień, mały bodziec będzie wywoływał ból. Zatem analogicznie im wyższe były rejestrowane wartości PT tym mniejsze doznania bólowe pochodziły z badanego obszaru.

3.8. Ocena napięcia mięśniowego

Do oceny napięcia mięśniowego zastosowano miotonometr (Neurogenic Technologis, USA 2010) - urządzeniem elektronicznym służącym do analizy powierzchniowego napięcia tkanek, określanego jako sztywność (rezystencja). Badanie to wykonywane jest głównie w celu oceny stanu funkcjonalnego mięśni szkieletowych. Polegało na ośmiokrotnym zagłębieniu głowicy sondy o wartości (0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,25; 1,50; 1,75; 2,00 kG) w wyznaczone miejsce na określoną w milimetrach głębokość i automatycznego wyliczenia tzw. obszaru pod krzywą (ang: *Area Under Curve* – AUC). Obszar pod krzywą (AUC) jest umowną jednostką, która nie posiada wartości referencyjnych, będąca w praktyce zintegrowaną wartością krzywej odkształcenia tkanek, siły zaaplikowanej przez miotonometr oraz wielkości przemieszczenia tkanki. Ponieważ bardziej napięty mięsień ulega mniejszemu odkształceniu, zatem im większa wartość AUC tym mniejsze napięcie powierzchniowe tkanek.

Zarówno w badaniu progu bólu jak w ocenie napięcia mięśniowego ze względu na wielokrotność pomiarów każdego punktu, w celu zwiększenia dokładności pomiarów należało precyzyjnie określić miejsce przyłożenia sondy, a następnie zaznaczyć je niezmywalnym markerem. Do wyznaczenia punktów wykorzystano stałe punkty odniesienia, będące strukturami anatomicznymi: kołec biodrowy przedni górny (KBPG), punkt leżący w połowie długości górnej krawędzi rzepki (KGR), guz kulszowy (GK) i punkt leżący w dole podkolanowym w połowie odcinka łączącego nadkłykcie boczny i przyśrodkowy kości udowej (DP). Po połączeniu KBPG z KGR i GK z DP otrzymano linie na których w połowie długości wykonywano badanie. W ten sposób wyznaczone punkty zyskały powtarzalność dla pomiarów

przed i po wysiłkiem biegowym, ale też możliwe było znalezienie tych samych punktów przed i po suplementacji, a także ujednolicono ten sam obszar mięśni u wszystkich zawodników.

3.9. Suplementacja

Przez cały okres badań zawodnicy stosowali zróżnicowaną dietę bez żadnej dodatkowej suplementacji. Po losowym zakwalifikowaniu do grupy suplementowanej lub grupy placebo badani przez trzy tygodnie przyjmowali doustnie wyłącznie zalecone w protokole badań dawki.

Grupa suplementowana (SUPL) - Lyprinol® (PCSO-524®, LYPIROL Pharmalink GmbH, Niemcy) uzyskiwanym na drodze ekstrakcji i stabilizacji z nowozelandzkiego małża zielonego (*Perna canaliculus* L.).

Dzienna dawka: 800 mg oliwy z oliwek, 400 mg stabilizowanego ekstraktu lipidowego zawierającego kwasy tłuszczowe w tym 58mg EPA i 44 mg DHA i 1,8 mg witaminy E;

Grupa placebo (PL) - żelatynowe kapsułki.

Dzienna dawka: 1200 mg oliwy z oliwek;

Badani przez trzy tygodnie przyjmowali 8 kapsułek dziennie (2x4), gdzie jedna kapsułka zawierała 100 g oliwy z oliwek i 50 g PCSO-524® w grupie SUPL i 150 g oliwy z oliwek w grupie PL.

3.10. Analiza statystyczna

W pierwszej kolejności dokonano oceny: zgodności rozkładu zmiennych zależnych z rozkładem normalnym testem Shapiro -Wilka (W), homogeniczności ich wariancji w porównywanych grupach testem Levene'a (F) oraz równości wariancji różnic w serii pomiarów testem Mauchly'ego w celu weryfikacji założeń analizy wariancji ANOVA z powtórzonymi pomiarami (Stanisz, 2007). Z uwagi na brak spełnienia ww. założeń w celu oceny różnic między porównywanymi grupami tj. placebo (PL) vs. suplementowana (SUPL), a także w serii kolejnych pomiarów 2 badanie vs. 1 badanie oraz spoczynek vs. bezpośrednio po wysiłku, 1 h po wysiłku i 24 h po wysiłku zastosowano testy nieparametryczne: Manna-Whitneya (U), Wilcoxon (T) oraz analizę wariancji rang Friedman (S), w ramach której przeprowadzono testy *post-hoc* Dunna z korektą Bonferroni'ego na porównania wielokrotne. Wielkość wpływu czynnika eksperymentalnego (suplementu) oceniono wykorzystując statystyki: r Cohena oraz współczynnika konkordancji W Kendalla, które w testach: Manna-Whitneya i Wilcoxon określają odpowiednio: $r = 0.1 - < 0.3$ – mały efekt, $r = 0.3 - < 0.5$ – średni

efekt i $r \geq 0.5$ – duży efekt, podczas gdy w teście Friedmana: $r < 0.1$ – mały efekt, $r = 0.1$ - <0.3 – średni efekt, ≥ 0.3 – duży efekt (*Cohen, 1988; Stanisz, 2007*).

W celu ujawnienia siły i kierunku ewentualnych zależności pomiędzy zmiennymi zastosowano współczynniki korelacji rang Spearmana (r_s). Z uwagi na zastosowanie nieparametrycznych procedur porównań międzygrupowy i wewnątrzgrupowych wszystkie wyniki przedstawiono za pomocą miary położenia i rozproszenia wyników tj. mediany (Me) i odchylenia ćwiartkowego (QD) (*Stanisz, 2007*).

Wnioskowanie statystyczne w zakresie weryfikacji przyjętych hipotez statystycznych prowadzono na poziomie istotności $\alpha = 0.05$. Obliczenia statystyczne wykonano z wykorzystaniem aplikacji IBM SPSS Statistics (Version 26.0).

4. WYNIKI BADAŃ

4.1. Wpływ suplementacji kompleksem lipidowym na indeks kwasów tłuszczowych u biegaczy długodystansowych

Wyniki badań przedstawiające stosunek nasyconych kwasów tłuszczowych do jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (NKT/JNKT), indeks nienasyconych kwasów tłuszczowych typu trans (ITRANS) i stosunek kwasu arachidonowego do kwasu eikozapentaenowego (AA/EPA) zestawiono w tabeli 4.1.

Tab. 4.1. Indeks kwasów tłuszczowych przed i po 3-tygodniowej suplementacji kompleksem lipidowym PSCO-524

Zmienna	Badanie	Grupa Me (QD)		r
		Placebo (n=11)	Suplement (n=12)	
NKT/JNKT	1	2.0 (0.3)	2.1 (0.1)	0.14
	2	2.1 (0.1)	2.1 (0.1)	0.11
ITRANS	1	0.2 (0.1)	0.3 (0.1)	0.19
	2	0.3 (0.1) #	0.3 (0.1)	0.12
AA/EPA	1	15.5 (2.1)	16.6 (2.8)	0.09
	2	11.2 (2.0) ###	9.7 (0.8) ###	0.32

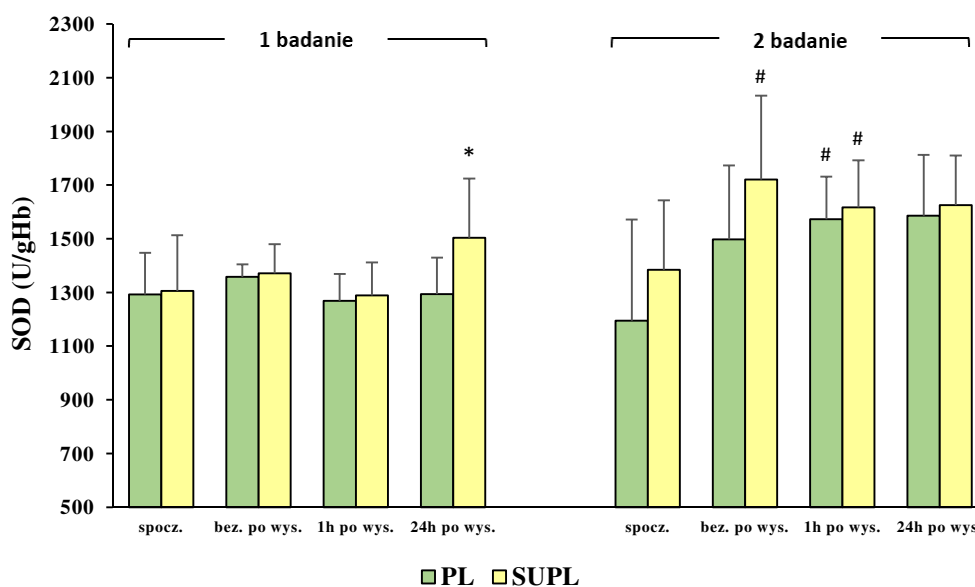
$p \leq 0.05$, ### $p \leq 0.001$ – istotność różnic względem analogicznych wartości otrzymanych badaniu 1;
r – wskaźnik wielkości wpływu

W przypadku omawianych wskaźników nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy grupami zarówno przed rozpoczęcia badań, jak i po 3-tygodniowej suplementacji kompleksem lipidowym. Trzytygodniowa suplementacja kwasami omega nie wpłynęła statystycznie na stosunek NKT/JNKT. Różnice statystycznie istotne ($p < 0,05$) dotyczyły zmian w indeksie kwasów tłuszczowych TRANS w grupie PL oraz stosunku AA/EPA w obu badanych grupach po 3 tygodniach suplementacji ($p \leq 0,001$).

4.2. Wpływ suplementacji kompleksem lipidowym na równowagę prooksydacyjno-antyoksydacyjną po wysiłku biegowym u biegaczy długodystansowych

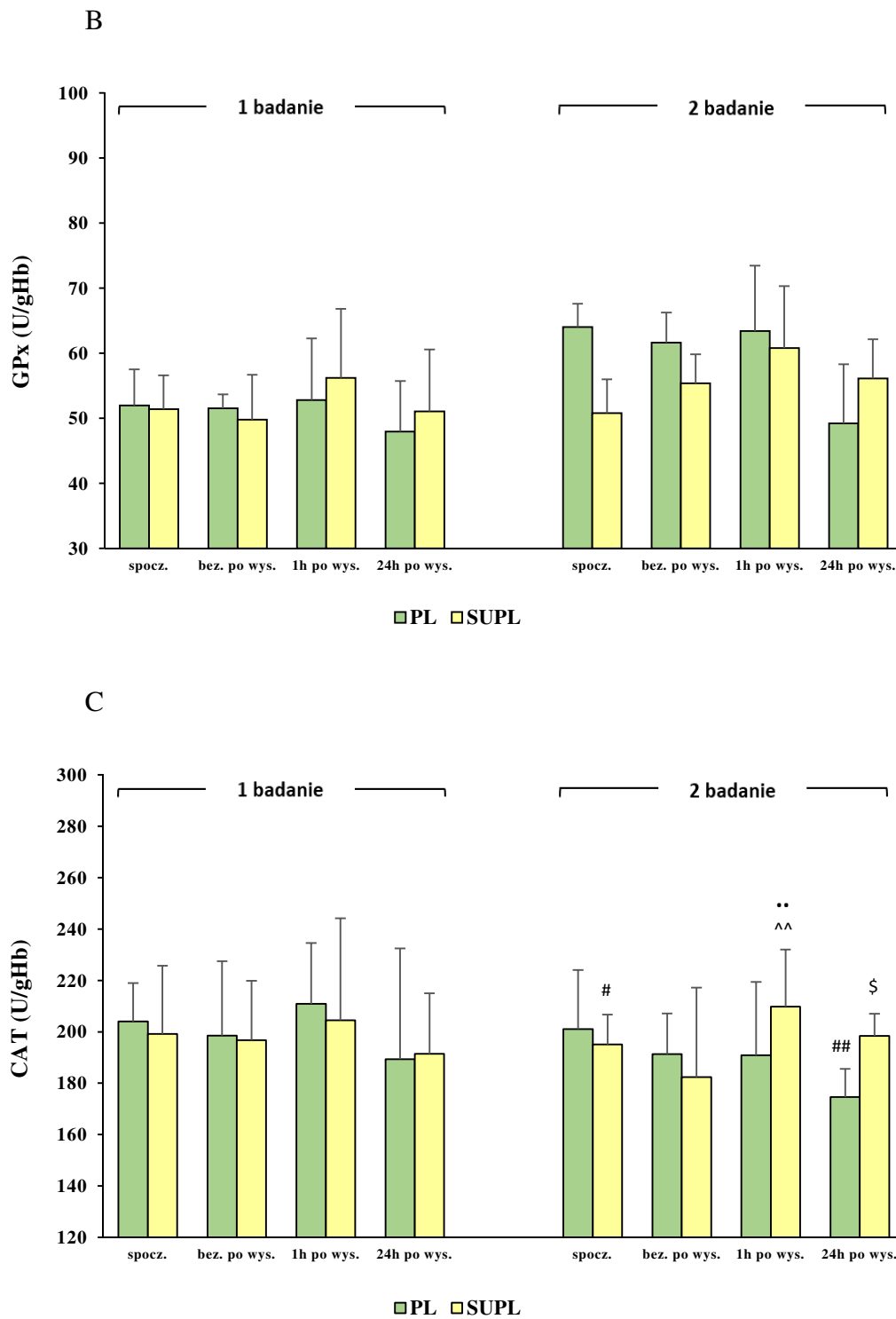
Na rycinach 4.1. – 4.3. przedstawiono wartości wybranych wskaźników równowagi prooksydacyjno-antyoksydacyjnej: dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), peroksydazy glutationowej (GPx), katalazy (CAT), zredukowanego glutationu (GSH) i dialdehydu malonowego (MDA), które były oznaczone przed i po suplementacji.

A



* $p < 0,05$ – istotność różnic względem analogicznych wartości otrzymanych w grupie PL

$p < 0,05$ – istotność różnic względem analogicznych wartości otrzymanych w badaniu 1



[#] $p < 0,05$, ^{##} $p < 0,01$ – istotność różnic względem analogicznych wartości otrzymanych w badaniu 1

^{^^} $p < 0,01$ – istotność różnic względem wartości spoczynkowych

^{**} $p < 0,01$ – istotność różnic względem wartości zarejestrowanych bezpośrednio po wysiłku fizycznym

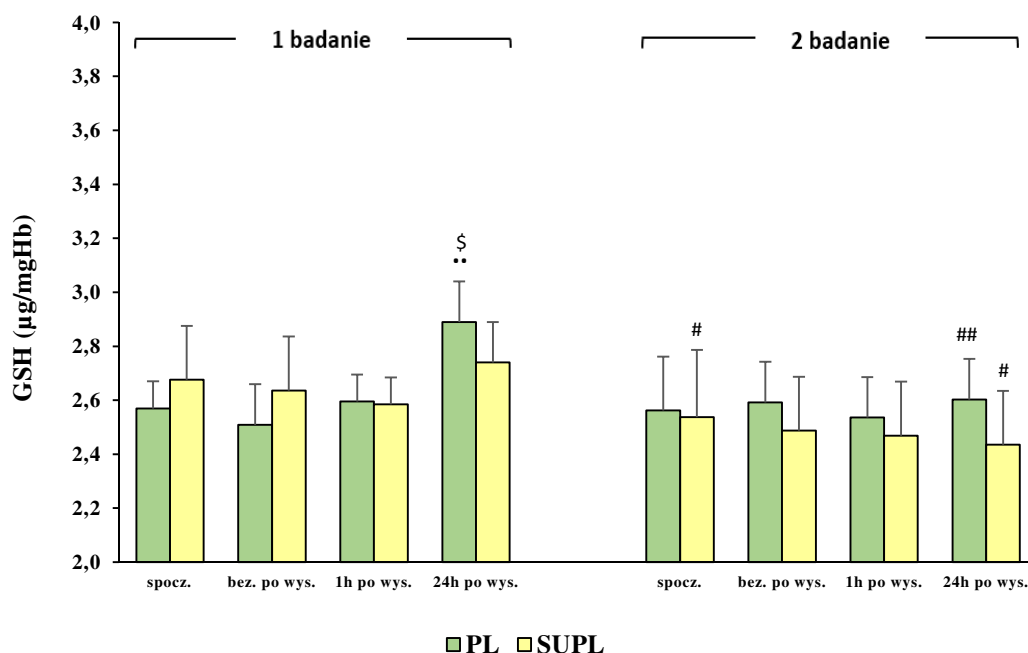
[§] $p < 0,05$ – istotność różnic względem wartości zarejestrowanych w 1 h po wysiłku fizycznym

Ryc. 4.1. Aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (A-SOD), peroksydazy glutationowej (B-GPx), katalazy (C-CAT) po wysiłku fizycznym i suplementacji kompleksem lipidowym.

Stwierdzono, że wyjściowe aktywności SOD w obu grupach były na zbliżonym poziomie. Znamienne ($p < 0,05$) międzygrupowe różnice w aktywności tego enzymu odnotowano w 24 h restytucji powysiłkowej w badaniu 1. Zastosowana suplementacja wpłynęła na statystycznie istotny ($p < 0,05$) wzrost aktywności SOD bezpośrednio po wysiłku i w 1 h restytucji w grupie SUPL oraz w 1 h restytucji w grupie PL w porównaniu do analogicznych wartości otrzymanych w badaniu 1 (**Ryc.4.1.A**).

W przypadku aktywności GPx nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy grupami. Ponadto, suplementacja kompleksem lipidowym nie wpłynęła znacząco na aktywność tego enzymu w obrębie grup (**Ryc. 4.1.B**).

Podobnie jak w przypadku SOD, wyjściowe aktywność CAT i nie różniły się statystycznie istotnie pomiędzy badanymi grupami. Po 3-tygodniowej suplementacji spoczynkowe wartości tego enzymu były znamienne niższe ($p < 0,05$) od obserwowanych w badaniu 1. Statystycznie istotnie niższą ($p < 0,01$) aktywność CAT stwierdzono w 24 h restytucji powysiłkowej w badaniu 2 względem analogicznych wartości w badaniu 1 w grupie PL. Ponadto aktywność CAT w grupie SUPL zarejestrowana w 1 h restytucji powysiłkowej była znamienne wyższa ($p < 0,01$) od wartości spoczynkowych i obserwowanych bezpośrednio po wysiłku w badaniu 2. W tej samej grupie znacząco wyższą ($p < 0,05$) aktywność tego enzymu obserwowano w 24h restytucji powysiłkowej w porównaniu do wartości zarejestrowanych w 1h po wysiłku w badaniu 2 (**Ryc.4.1.C**).



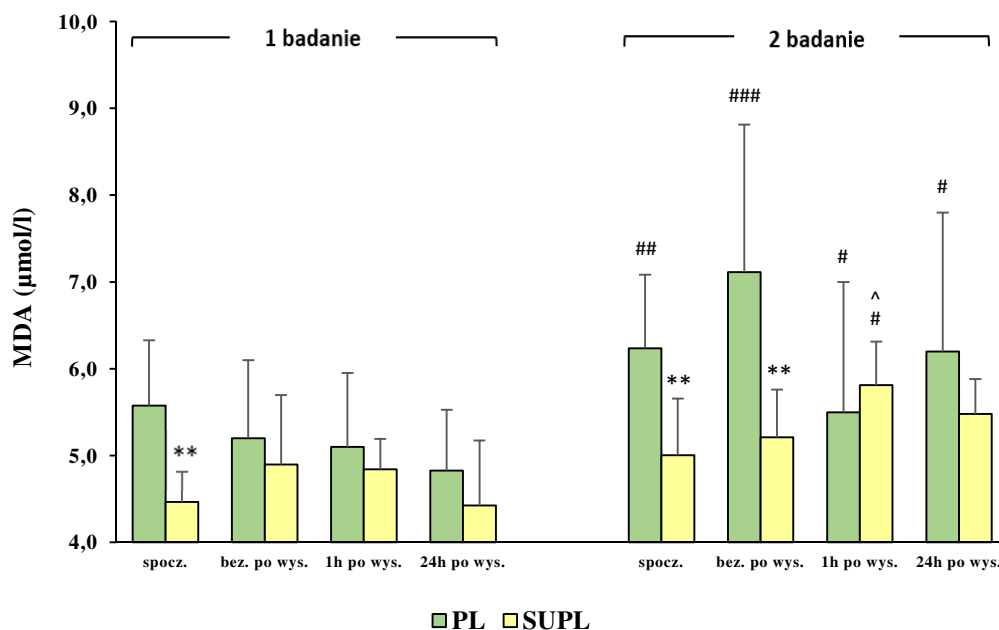
$p < 0,05$, ## $p < 0,01$ – istotność różnic względem analogicznych wartości otrzymanych w badaniu 1

** $p < 0,01$ – istotność różnic względem wartości zarejestrowanych bezpośrednio po wysiłku fizycznym

^s $p < 0,05$ – istotność różnic względem wartości zarejestrowanych w 1 h po wysiłku fizycznym

Ryc. 4.2. Stężenie zredukowanego glutationu (GSH) po wysiłku fizycznym i suplementacji

Wyjściowe stężenia GSH były na zbliżonym poziomie w obu badanych grupach. W badaniu 1 stężenie GSH zarejestrowane w 24h restytucji powysiłkowej w grupie PL było statystycznie wyższe od wartości obserwowanych bezpośrednio po wysiłku ($p < 0,01$) i w 1h restytucji powysiłkowej ($p < 0,05$). Z kolei w badaniu 2, w tej samej grupie, wartości GSH w 24h restytucji powysiłkowej były statystycznie niższe ($p < 0,01$) od analogicznych w badaniu 1. Po 3-tygodniowej suplementacji kompleksem lipidowym wartości spoczynkowe i obserwowane w 24h po wysiłku były statystycznie istotnie niższe ($p < 0,05$) od analogicznych w badaniu 1 (**Ryc.4.2**).



** $p < 0,01$ – istotność różnic względem analogicznych wartości otrzymanych w grupie PL

$p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ – istotność różnic względem analogicznych wartości otrzymanych w badaniu 1

^ $p < 0,05$ – istotność różnic względem wartości spoczynkowych

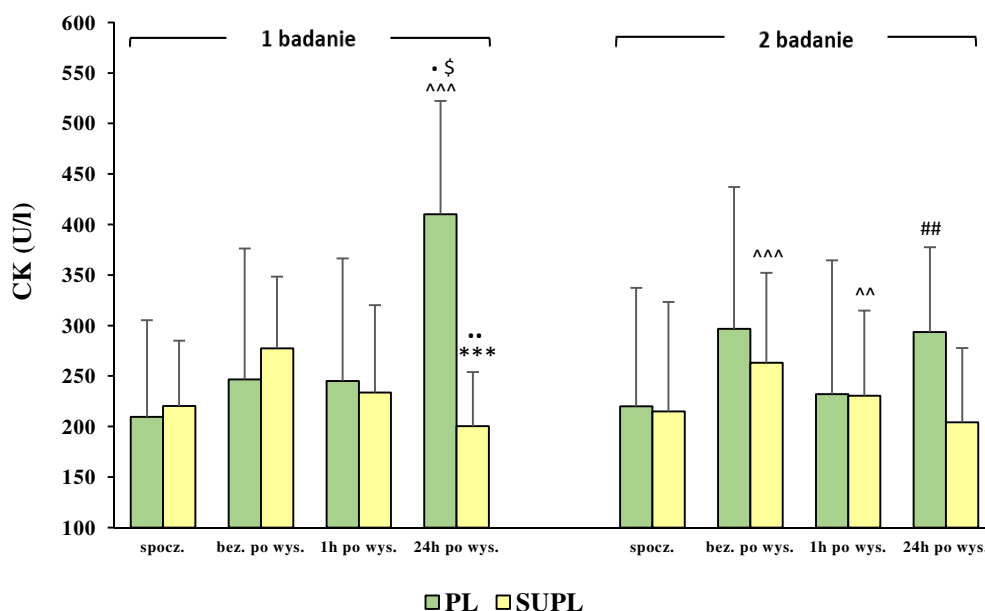
Ryc. 4.3. Stężenie produktów peroksydacji lipidów z kwasem tiobarbiturowym (MDA) po wysiłku fizycznym i suplementacji kompleksem lipidowym.

W przypadku stężenia MDA w osoczu krwi obserwowano znamienne niższe ($p < 0,01$) spoczynkowe (w badaniu 1 i 2) i zarejestrowane bezpośrednio po wysiłku (badanie 2) wartości w grupie SUPL względem grupy PL. W badaniu 2 w grupie PL wartości spoczynkowe ($p < 0,05$), bezpośrednio po wysiłku ($p < 0,001$) w 1 i 24 h restytucji powysiłkowej ($p < 0,05$) były statystycznie istotnie wyższe od analogicznych obserwowanych w badaniu 1. W grupie SUPL MDA w 1h restytucji powysiłkowej było statystycznie istotnie wyższe ($p < 0,05$) od wartości spoczynkowych i od analogicznych zarejestrowanych przed rozpoczęciem suplementacji (**Ryc.4.3.**).

4.3. Wpływ suplementacji kompleksem lipidowym na poziom markerów uszkodzenia błon komórek po wysiłku biegowym u biegaczy długodystansowych

W badaniach dokonano oceny stanu funkcjonalnego błon komórek mięśniowych na podstawie zmian aktywności kinazy kreatynowej (CK), dehydrogenazy mleczanowej (LDH), a także stężenia troponiny (TnT) i mioglobiny (Mb). Zebrane wyniki przedstawiono na rycinie 4.4. A-D.

A



*** $p < 0,001$ – istotność różnic względem analogicznych wartości otrzymanych w grupie PL

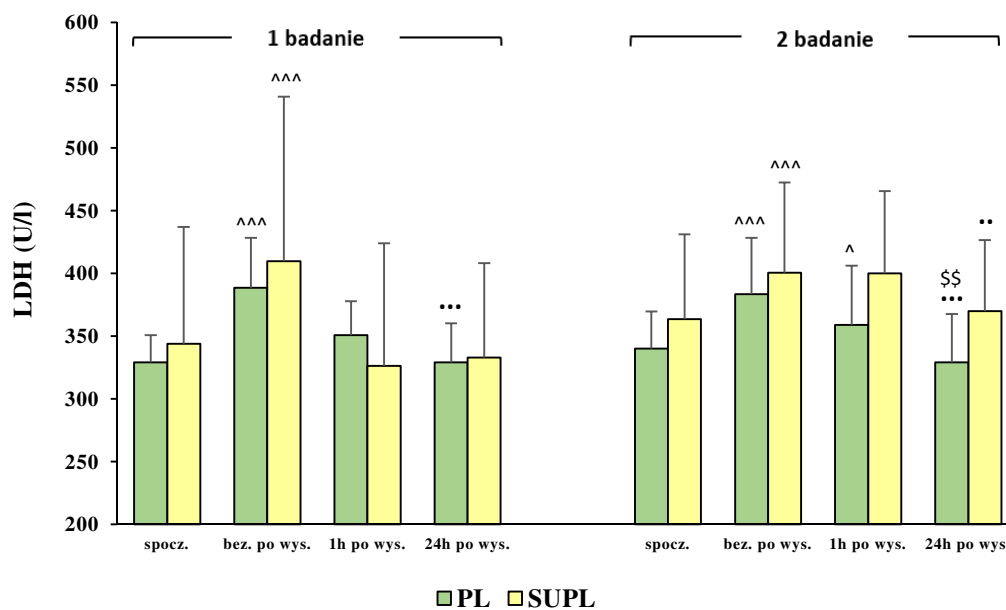
$p < 0,01$ – istotność różnic względem analogicznych wartości otrzymanych w badaniu 1

^ $p < 0,05$, ^^ $p < 0,01$, ^^^ $p < 0,001$ – istotność różnic względem wartości spoczynkowych

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ – istotność różnic względem wartości zarejestrowanych bezpośrednio po wysiłku

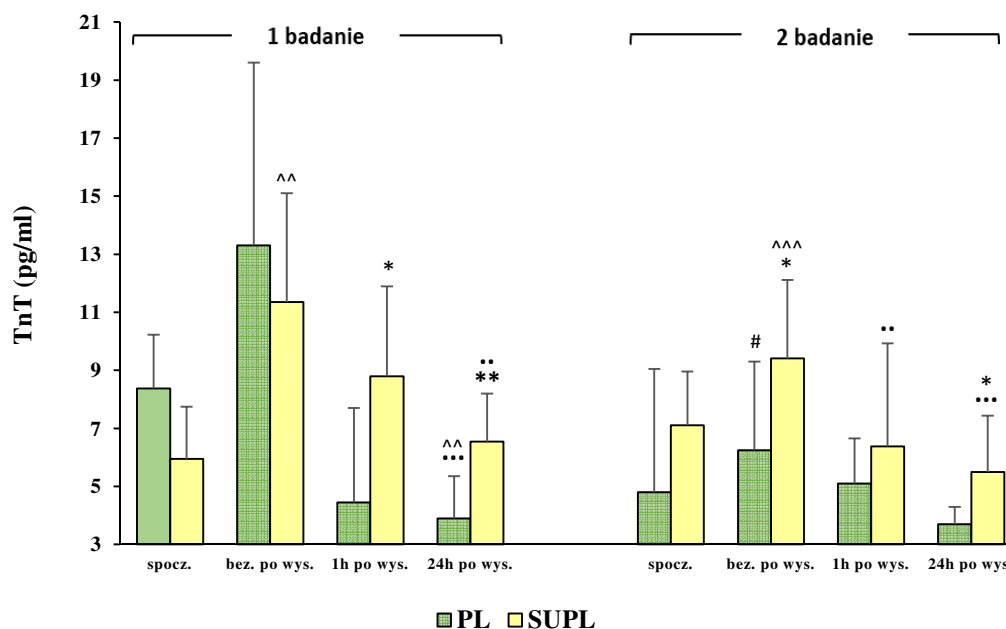
§ $p < 0,05$ – istotność różnic względem wartości zarejestrowanych 1 h po wysiłku w obrębie jednej grupy i jednego badania

B



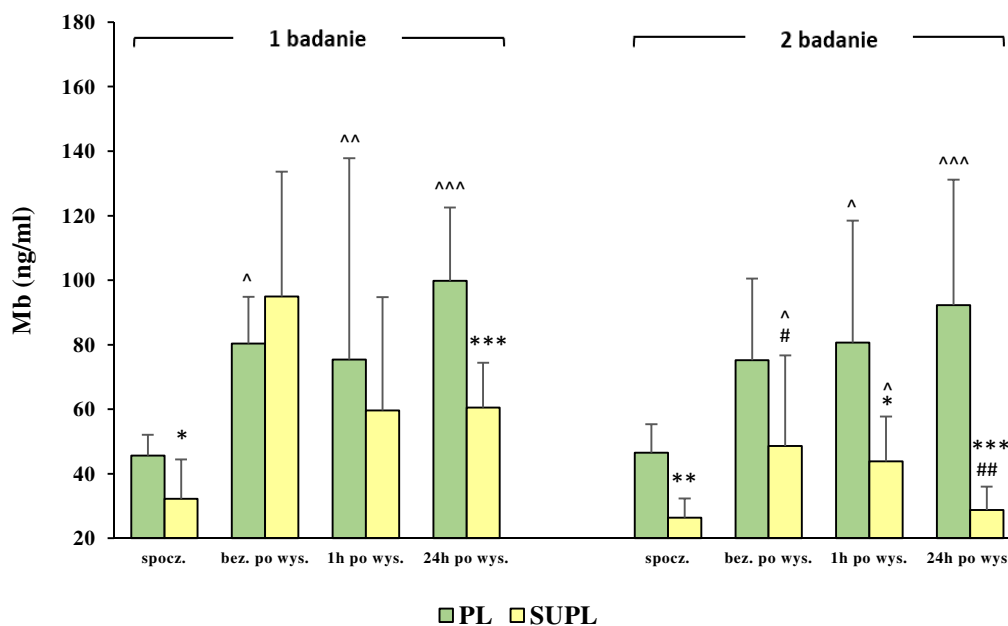
[^] $p < 0.05$, ^{^^} $p < 0.001$ – istotność różnic względem wartości spoczynkowych
^{**} $p < 0.01$, ^{***} $p < 0.001$ – istotność różnic względem wartości zarejestrowanych bezpośrednio po wysiłku
^{\$\$} $p < 0.01$ – istotność różnic względem wartości zarejestrowanych 1 h po wysiłku

C



^{*} $p < 0.05$, ^{**} $p < 0.01$ – istotność różnic względem analogicznych wartości otrzymanych w grupie PL
[#] $p < 0.05$ – istotność różnic względem analogicznych wartości otrzymanych w badaniu 1
^{^^} $p < 0.01$, ^{^^^} $p < 0.001$ – istotność różnic względem wartości spoczynkowych
^{**} $p < 0.01$, ^{***} $p < 0.001$ – istotność różnic względem wartości zarejestrowanych bezpośrednio po wysiłku

D



* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ – istotność różnic względem analogicznych wartości otrzymanych w grupie PL
 # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### – istotność różnic względem analogicznych wartości otrzymanych w badaniu 1
 ^ $p < 0.05$, ^^ $p < 0.01$, ^^ $p < 0.001$ – istotność różnic względem wartości spoczynkowych

Ryc. 4.4. Aktywność kinazy kreatynowej (CK, A), dehydrogenazy mleczanowej (LDH, B), stężenia troponiny (TnT, C) i mioglobiny (Mb, D) po wysiłku fizycznym i suplementacji kompleksem lipidowym.

Wyjściowe aktywności CK były na zbliżonym poziomie. W grupie SUPL aktywność tego enzymu znacznie wzrosła bezpośrednio po wysiłku, po czym uległa znacznemu obniżeniu w 1 i 24h restytucji powysiłkowej w obu badaniach. Podobną tendencję obserwowano w grupie PL, za wyjątkiem 24h restytucji powysiłkowej, gdzie aktywność tego enzymu była znamienne wyższa od wartości spoczynkowych oraz zarejestrowanych bezpośrednio po- i w 1h po wysiłku w badaniu 1. W badaniu drugim tendencja była podobna, choć aktywności CK w badaniu 2 w 24h restytucji powysiłkowej były statystycznie istotnie niższe ($p < 0,01$) od obserwowanych w badaniu 1 (**Ryc. 4.4.A**).

Podobnie jak w przypadku CK, spoczynkowe aktywności LDH zarejestrowane w badaniu 1 nie różniły się statystycznie istotnie. Test wysiłkowy wpłynął na statystycznie istotny wzrost LDH bezpośrednio po wysiłku w badaniu 1 i 2 w obu grupach oraz w 1h restytucji powysiłkowej w badaniu 2 w grupie PL. Ponadto, w 24h po wysiłku LDH uległo obniżeniu w stosunku do wartości uzyskanych bezpośrednio po wysiłku w grupie SUPL ($p < 0,01$) i PL ($p < 0,001$). W grupie SUPL wartości LDH zarejestrowane w badaniu 1 i 2

obserwowane w 24h po wysiłku były znamienne wyższe niższe ($p < 0,001$) od obserwowanych w 1h restytucji powysiłkowej (**Ryc.4.4.B**).

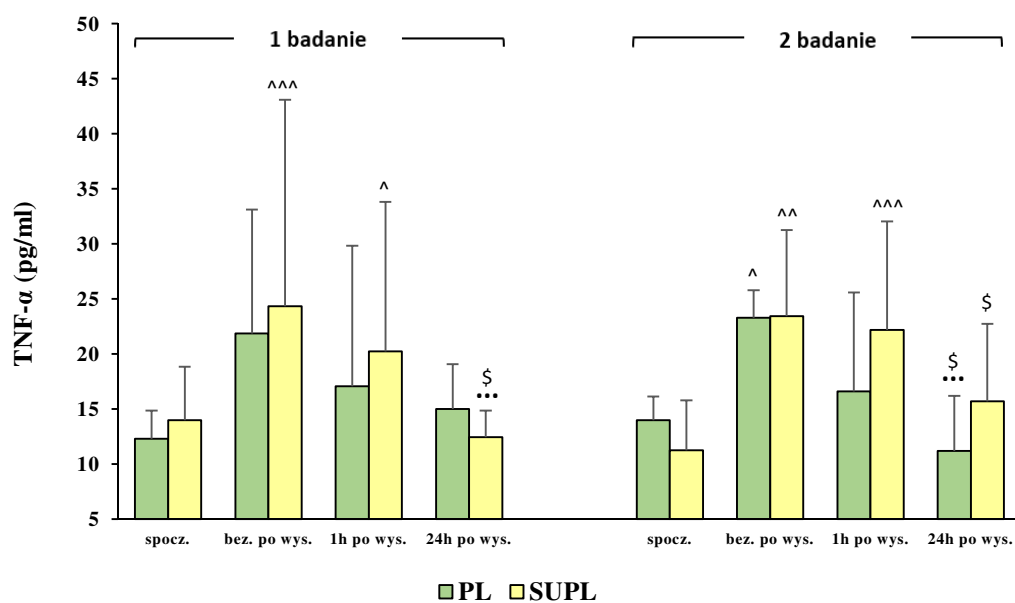
Nie odnotowano znamienych różnic międzygrupowych w wyjściowym poziomie TnT. Podobnie jak w przypadku aktywności CK i LDH test wysiłkowy indukował wzrost tego markera w surowicy krwi w obu grupach i w obu badaniach z tendencją do sukcesywnego obniżenia się jego poziomu w 1 i 12h po wysiłku. Znamienne wyższe jego wartości w 1h i 24 restytucji powysiłkowej (badanie 1) oraz bezpośrednio po wysiłku i w 24h restytucji powysiłkowej (badanie2) obserwowano w grupie SUPL względem analogicznych wartości w grupie PL. W grupie PL powysiłkowe poziomy TnT były w większości znamienne niższe od zarejestrowanych bezpośrednio po wysiłku w obu badaniach (**Ryc.4.4.C**).

W przypadku Mb stwierdzono statystycznie istotne różnice w wyjściowych stężeniach pomiędzy badanymi grupami w badaniu 1 ($p < 0,05$) i w badaniu 2 ($p < 0,01$). Niezależnie od badanej grupy test wysiłkowy indukował wzrost stężenia tego białka w surowicy krwi. W grupie SUPL powysiłkowe stężenia Mb były wciąż znamienne wyższe od spoczynkowych. W przypadku grupy PL, zwłaszcza w badaniu 2, obserwowano tendencję odwrotną. Wartości Mb w grupie SUPL w 24h po wysiłku, niezależnie od badania, były wysoce znamienne niższe ($p < 0,001$) od analogicznych w grupie PL.

4.4. Wpływ suplementacji kompleksem lipidowym na poziom mediatorów stanu zapalnego po wysiłku biegowym u biegaczy długodystansowych

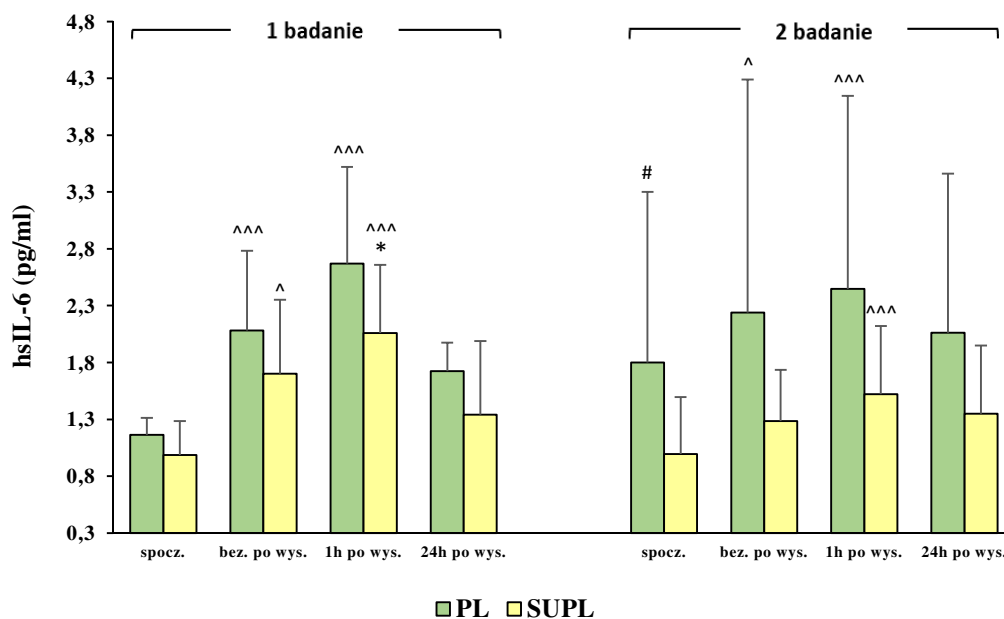
Na rycinie 4.5. przedstawiono wyniki czynnika martwicy nowotworów (TNF- α , A) i interleukiny 6 (hsIL-6, B).

A



^ $p < 0.05$, ^^ $p < 0.01$, ^^^ $p < 0.001$ – istotność różnic względem wartości spoczynkowych
 *** $p < 0.001$ – istotność różnic względem wartości zarejestrowanych bezpośrednio po wysiłku
 § $p < 0.05$ – istotność różnic względem wartości zarejestrowanych 1 h po wysiłku

B



* $p < 0.05$ – istotność różnic względem analogicznych wartości otrzymanych w grupie PL
 # $p < 0.05$ – istotność różnic względem analogicznych wartości otrzymanych w badaniu 1
 ^ $p < 0.05$, ^^ $p < 0.01$, ^^^ $p < 0.001$ – istotność różnic względem wartości spoczynkowych

Ryc. 4.5. Poziom TNF- α (A) i hsIL-6 (B) po wysiłku fizycznym i suplementacji kompleksem lipidowym.

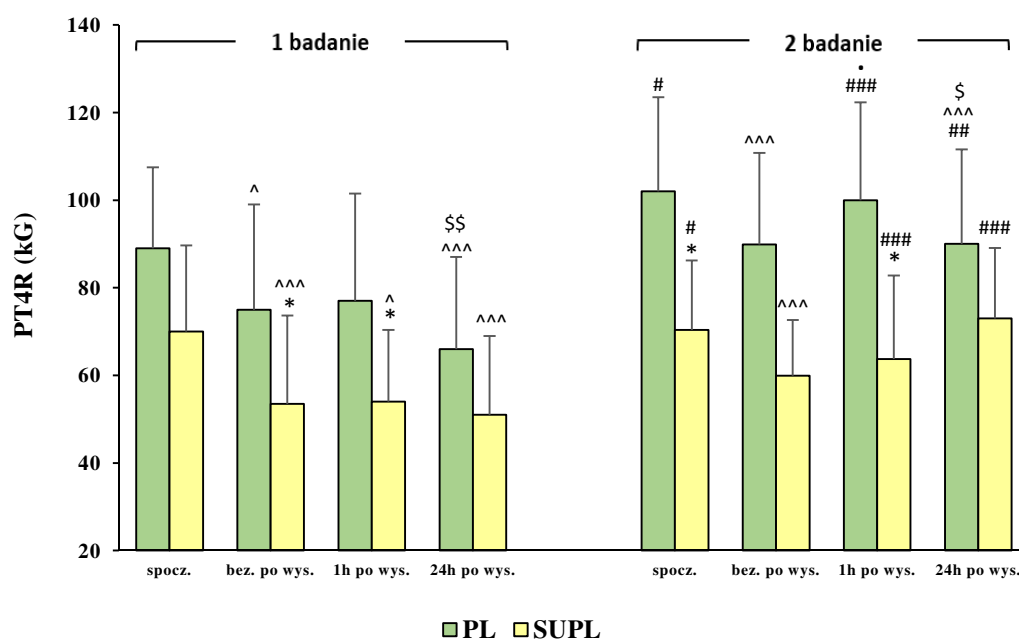
Wyjściowe różnice w poziomie TNF- α były statystycznie nieznamienne. Test biegowy wpłynął na istotny ($p < 0,001$) wzrost tego wskaźnika bezpośrednio po wysiłku, z tendencją do obniżania się w 1 i 24 h restytucji powysiłkowej w badaniu 1 i 2 w grupie SUPL. Podobną, choć w większości nieistotną zależność obserwowano w grupie PL. Najniższe, statystycznie istotne wartości TNF- α odnotowano w 24h po wysiłku w grupie SUPL i w większości nieistotne w grupie PL (**Ryc. 4.5.A**).

Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic międzygrupowych pomiędzy wyjściowymi poziomami hsIL-6. Test biegowy z przewagą skurczy ekscentrycznych indukował znamienne wzrost hsIL-6 bezpośrednio po wysiłku w badaniu 1 i 2, w obu badanych grupach i w badaniu 2 w grupie PL. Ponadto niezależnie od badania, w obu badanych grupach stwierdzono statystycznie istotne różnice w hsIL-6 pomiędzy spoczynkowymi wartościami a zarejestrowanymi w 1h po wysiłku, z tendencją do obniżenia stężenia tej interleukiny w 24h godzinie restytucji powysiłkowej. Stwierdzono również, że w badaniu 2 w grupie PL spoczynkowe wartości hsIL-6 były znamienne wyższe ($p < 0,05$) od analogicznych zarejestrowanych w badaniu 1 (**Ryc. 4.5.B**).

4.5.Wpływ suplementacji kompleksem lipidowym na stopień regeneracji w spoczynku i po wysiłku biegowym u biegaczy długodystansowych

Wyniki badania progu bólu (PT) zamieszczono na rycinach 4.6. (A - mięsień czworogłowy prawy PT4R, B - lewy PT4L) i 4.7. (A - mięsień dwugłowy prawy PT2R, B - lewy PT2L).

A



* $p < 0.05$ – istotność różnic względem analogicznych wartości otrzymanych w grupie PL

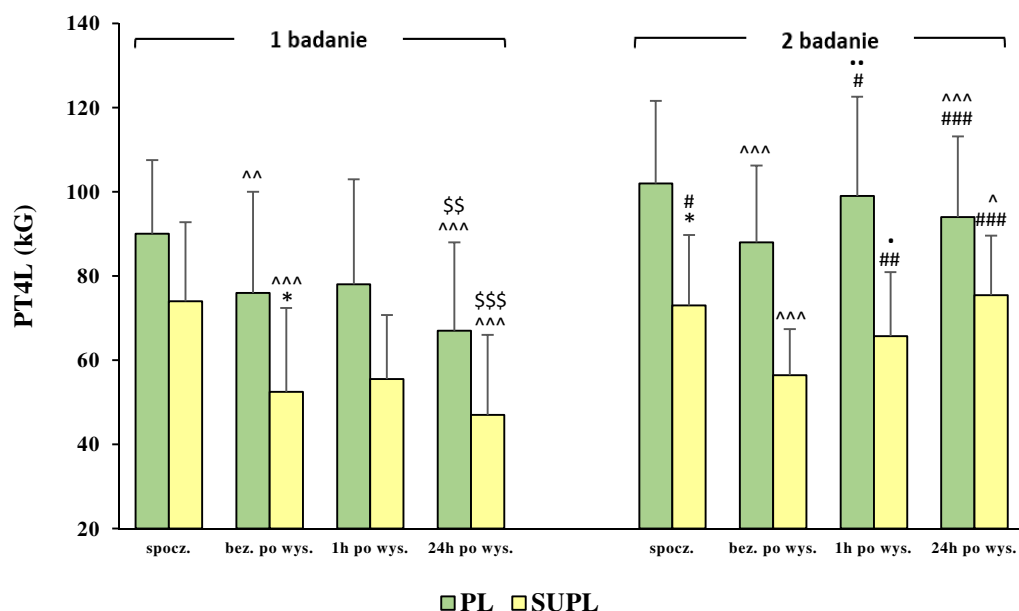
$p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ – istotność różnic względem analogicznych wartości otrzymanych w badaniu 1

^ $p < 0.05$, ^^ $p < 0.001$ – istotność różnic względem wartości spoczynkowych

* $p < 0.05$ – istotność różnic względem wartości zarejestrowanych bezpośrednio po wysiłku

§ $p < 0.05$, §§ $p < 0.01$ – istotność różnic względem wartości zarejestrowanych 1 h po wysiłku

B



* $p < 0.05$ – istotność różnic względem analogicznych wartości otrzymanych w grupie suplementowanej

$p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ – istotność różnic względem analogicznych wartości otrzymanych w badaniu 1

^^ $p < 0.01$, ^^^ $p < 0.001$ – istotność różnic względem wartości spoczynkowych

* $p < 0.05$, * $p < 0.01$ – istotność różnic względem wartości zarejestrowanych bezpośrednio po wysiłku

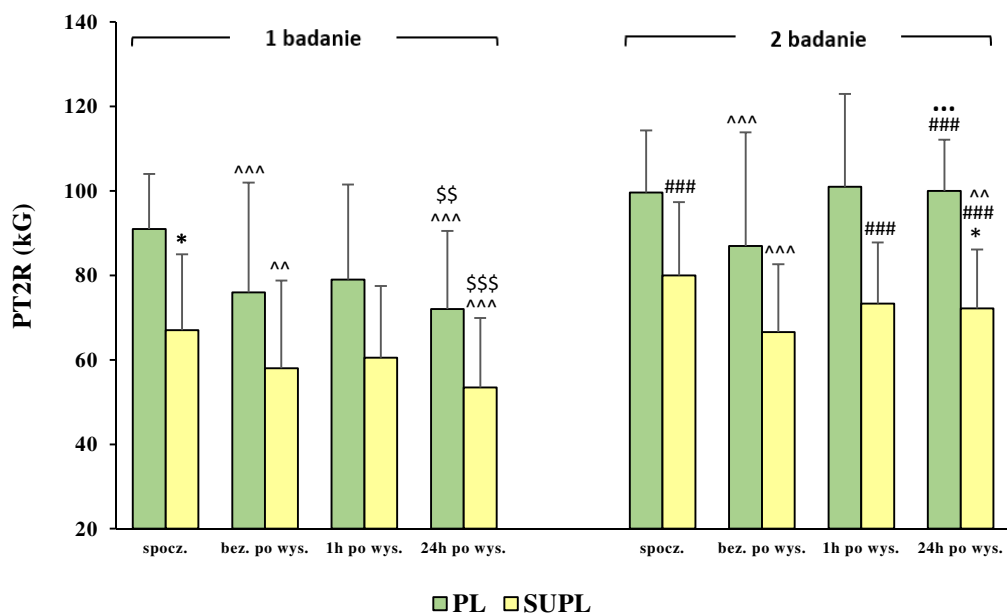
§§ $p < 0.01$, §§§ $p < 0.001$ – istotność różnic względem wartości zarejestrowanych 1 h po wysiłku

Ryc. 4.6. Próg bólu mięśni czworogłowego uda kończyny prawej (A) i lewej (B) po wysiłku fizycznym i suplementacji kompleksem lipidowym.

W badaniu PT4R stwierdzono istotnie ($p<0,05$) różnice wartości wyjściowych w grupie PL względem grupy SUPL w badaniu 2. Znamienne wyższy ($p<0,05$) poziom PT w grupie PL zaobserwowano także w 1h restytucji powysiłkowej w obu badaniach i bezpośrednio po wysiłku w badaniu 1. Zastosowany test biegowy indukował istotny spadek PT bezpośrednio po wysiłku względem wartości spoczynkowych niezależnie od zastosowanego suplementu, który utrzymywał się w 24h restytucji powysiłkowej w obu grupach w badaniu 1 i w grupie PL w badaniu 2. Ponad to w grupie PL 24h po wysiłku wartość PT była istotnie niższa ($p<0,01$) od uzyskanej w 1h godzinie restytucji powysiłkowej. Stwierdzono istotny wzrost wartości PT w badaniu 2 w pomiarze spoczynkowym, w 1h i 24h restytucji powysiłkowej niezależnie od przyjmowanego suplementu (**Ryc.4.6.A**).

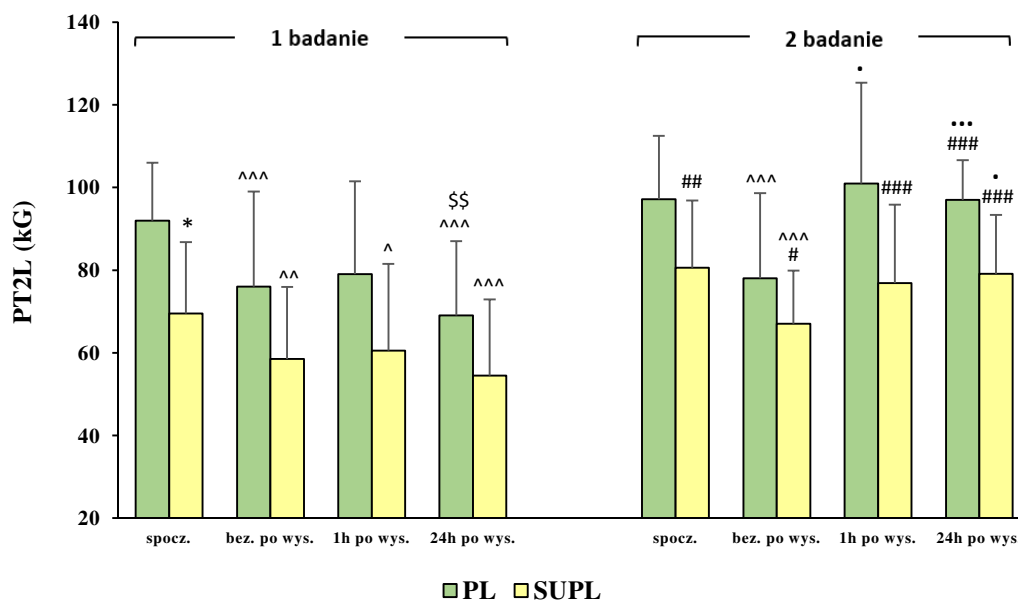
Podobnie jak w kończynie prawej w badaniu PT4L stwierdzono istotnie wyższy ($p<0,05$) poziom wartości wyjściowych w grupie PL w badaniu 2, a także w badaniu 1 bezpośrednio po wysiłku. Niezależnie od suplementacji w obu badaniach test biegowy spowodował spadek wartości PT bezpośrednio po wysiłku, który również utrzymywał się w 24h restytucji powysiłkowej w obu grupach w badaniu 1 i w grupie PL w badaniu 2. Z kolei w grupie SUPL po zakończonej suplementacji w 24h restytucji stwierdzono istotny wzrost PT względem wartości spoczynkowych. W obu grupach najniższe wartości PT uzyskane w badaniu 1 w 24h po wysiłku różniły się znamienne względem pomiaru z 1h restytucji powysiłkowej, a w badaniu 2 wartości PT w 1h po wysiłku były istotnie wyższe od uzyskanych bezpośrednio po wysiłku. Podobnie jak w PT4R w obu grupach stwierdzono istotny wzrost wartości PT w badaniu 2 w pomiarze w 1h i 24h restytucji powysiłkowej oraz w pomiarze spoczynkowym w grupie SUPL względem analogicznych pomiarów w badaniu 1 (**Ryc.4.6.B**).

A



* $p < 0.05$ – istotność różnic względem analogicznych wartości otrzymanych w grupie placebo
 ### $p < 0.001$ – istotność różnic względem analogicznych wartości otrzymanych w badaniu 1
 ^^ $p < 0.01$, ^^^ $p < 0.001$ – istotność różnic względem wartości spoczynkowych
 *** $p < 0.001$ – istotność różnic względem wartości zarejestrowanych bezpośrednio po wysiłku
 \$\$ $p < 0.01$, \$\$\$ $p < 0.001$ – istotność różnic względem wartości zarejestrowanych 1 h po wysiłku

B



* $p < 0.05$ – istotność różnic względem analogicznych wartości otrzymanych w grupie placebo
 # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ – istotność różnic względem analogicznych wartości otrzymanych w badaniu 1
 ^ $p < 0.05$, ^^ $p < 0.01$, ^^^ $p < 0.001$ – istotność różnic względem wartości spoczynkowych
 * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ – istotność różnic względem wartości zarejestrowanych bezpośrednio po wysiłku
 \$\$ $p < 0.01$ – istotność różnic względem wartości zarejestrowanych 1 h po wysiłku

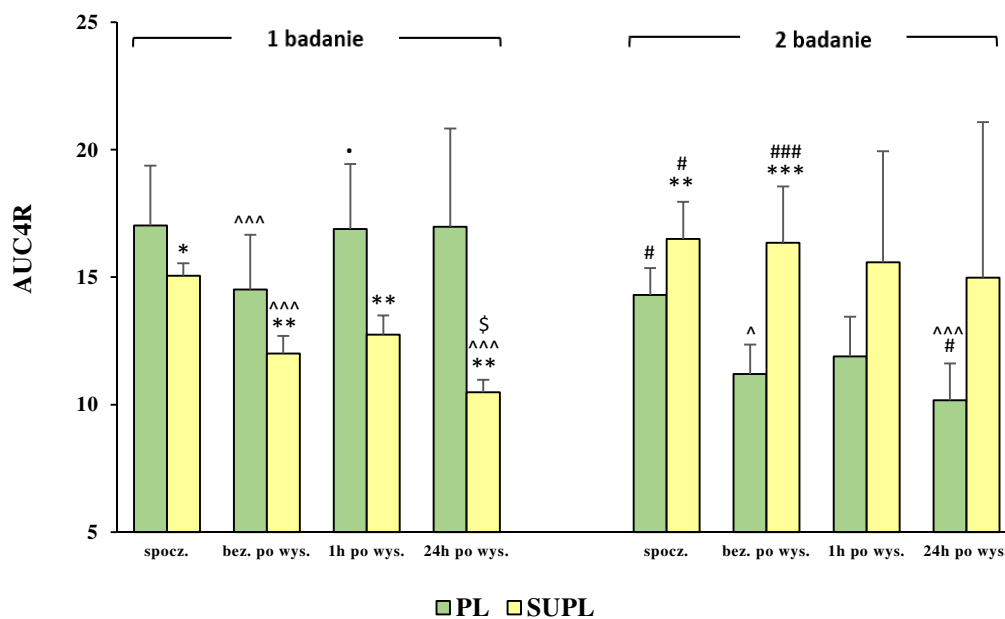
Ryc. 4.7. Próg bólu mięśni czworogłowego uda kończyny prawej (A) i lewej (B) po wysiłku fizycznym i suplementacji kompleksem lipidowym.

W badaniu PT2R stwierdzono istotnie wyższe ($p<0,05$) spoczynkowe wartości w grupie PL w badaniu 1. Istotne różnice międzygrupowe zarejestrowano również w badaniu 2 w 24h restytucji powysiłkowej ($p<0,05$). Niezależnie od przyjmowanego suplementu test biegowy z przewagą skurczy ekscentrycznych powodował w obu badaniach istotny spadek poziomu PT bezpośrednio po wysiłku. W badaniu 1 w obu grupach najniższe wartości PT osiągnęte były w 24h restytucji powysiłkowej, gdzie stwierdzono również istotne różnice względem pomiaru z 1h po wysiłku ($p<0,01$). W grupie PL w badaniu 2 wartości PT w 24h restytucji powysiłkowej istotnie wzrosły ($p<0,001$) względem uzyskanych bezpośrednio po wysiłku. Istotne różnice między badaniami dotyczyły wzrostu wartości pomiarów spoczynkowych oraz w 1h i 24h restytucji powysiłkowej w grupie SUPL, a także pomiarów z 24h restytucji powysiłkowej w grupie PL (**Ryc. 4.7.A**).

W kończynie lewej spoczynkowe wartości PT były również istotnie wyższe ($p<0,05$) w grupie PL w badaniu 1. Podobnie jak w kończynie prawej w obu badaniach dla obu grup stwierdzono znamienne obniżenie poziomu PT bezpośrednio po wysiłku i osiągnięcie najniższych wartości w 24h restytucji powysiłkowej w badaniu 1 z istotnie niższym PT względem wartości z 1h restytucji w grupie PL. Dodatkowo w badaniu 1 zaobserwowano istotnie niższe wartości PT w 1h po wysiłku względem wartości spoczynkowych w grupie SUPL. Z kolei w badaniu 2 w 24h restytucji powysiłkowej obu grupach i w 1h restytucji w grupie PL zarejestrowano znamienny wzrost PT względem wartości uzyskanych bezpośrednio po wysiłku. Istotne różnice między badaniami dotyczyły wzrostu wartości wszystkich pomiarów w grupie SUPL, a także pomiarów z 24h restytucji powysiłkowej w grupie PL (**Ryc.4.7.B**).

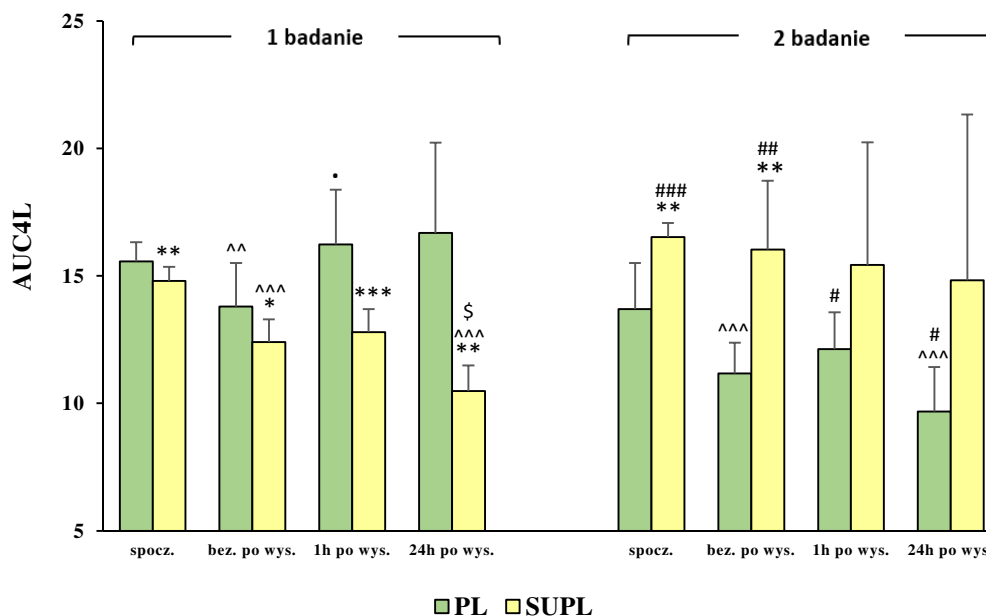
Wyniki badania napięcia mięśniowego zamieszczono na rycinach 4.8. (A - mięsień czworogłowy prawy AUC4R, B - lewy AUC4L) i 4.9. (A - mięsień dwugłowy prawy AUC2R, B – lewy AUC2L).

A



* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ – istotność różnic względem analogicznych wartości otrzymanych w grupie placebo
 # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ – istotność różnic względem analogicznych wartości otrzymanych w badaniu 1
 ^ $p < 0.05$, ^^ $p < 0.01$ – istotność różnic względem wartości spoczynkowych
 • $p < 0.05$ – istotność różnic względem wartości zarejestrowanych bezpośrednio po wysiłku
 § $p < 0.05$ – istotność różnic względem wartości zarejestrowanych 1 h po wysiłku

B



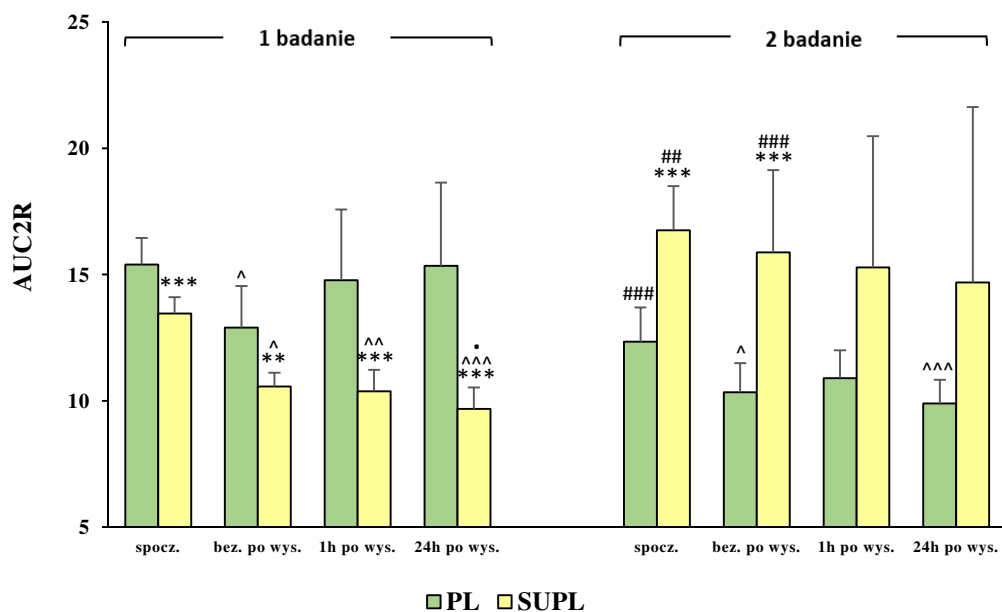
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ – istotność różnic względem analogicznych wartości otrzymanych w grupie placebo
 # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ – istotność różnic względem analogicznych wartości otrzymanych w badaniu 1
 ^^ $p < 0.01$, ^^ $p < 0.001$ – istotność różnic względem wartości spoczynkowych
 • $p < 0.05$ – istotność różnic względem wartości zarejestrowanych bezpośrednio po wysiłku
 § $p < 0.05$ – istotność różnic względem wartości zarejestrowanych 1 h po wysiłku

Ryc. 4.8. Napięcie mięśniowe mięśnia czworogłowego uda kończyny prawej (A) i lewej (B) po wysiłku fizycznym i suplementacji kompleksem lipidowym.

W mięśniu czworogłowym kończyny prawej w obu badaniach stwierdzono istotne różnice między grupami. Przed rozpoczęciem suplementacji w grupie PL uzyskano istotnie wyższe wartości AUC we wszystkich pomiarach, a po zakończonej suplementacji istotnie niższe w pomiarze spoczynkowym ($p \leq 0,01$) i uzyskanym bezpośrednio po wysiłku ($p \leq 0,001$). Test biegowy indukował istotny spadek wartości AUC bezpośrednio po wysiłku, a następnie wzrost poziomu AUC w 1h restytucji względem wartości uzyskanych bezpośrednio po wysiłku w obu grupach w badaniu 1 i w badaniu 2 w grupie PL. W 24h restytucji powysiłkowej w grupie SUPL zarejestrowano istotny spadek wartości AUC względem wartości spoczynkowych i uzyskanych w 1h restytucji w badaniu 1, obecny również w grupie PL względem wartości spoczynkowych w badaniu 2. Istotne różnice między badaniami dotyczyły wzrostu wartości w pomiarach spoczynkowych i bezpośrednio po wysiłku w grupie SUPL i spadku wartości w pomiarach spoczynkowych i w 24h restytucji powysiłkowej w grupie PL względem analogicznych pomiarów w badaniu 1 (**Ryc.4.8.A**).

Podobnie jak w badaniu AUC4R w kończynie lewej stwierdzono istotnie wyższe wartości AUC we wszystkich pomiarach w badaniu 1 oraz istotnie niższe ($p \leq 0,01$) wartości w pomiarze spoczynkowym i uzyskanym bezpośrednio po wysiłku w badaniu 2. Zmiany poziomu AUC wywołane wysiłkiem biegowym zachowały dokładnie taką samą tendencję jak w kończynie prawej. Istotne różnice między badaniami dotyczyły również wzrostu wartości w pomiarach spoczynkowych i bezpośrednio po wysiłku w grupie SUPL, a w grupie PL spadku wartości w pomiarach w 1h i w 24h restytucji powysiłkowej względem analogicznych pomiarów w badaniu 1 (**Ryc.4.8.B**).

A



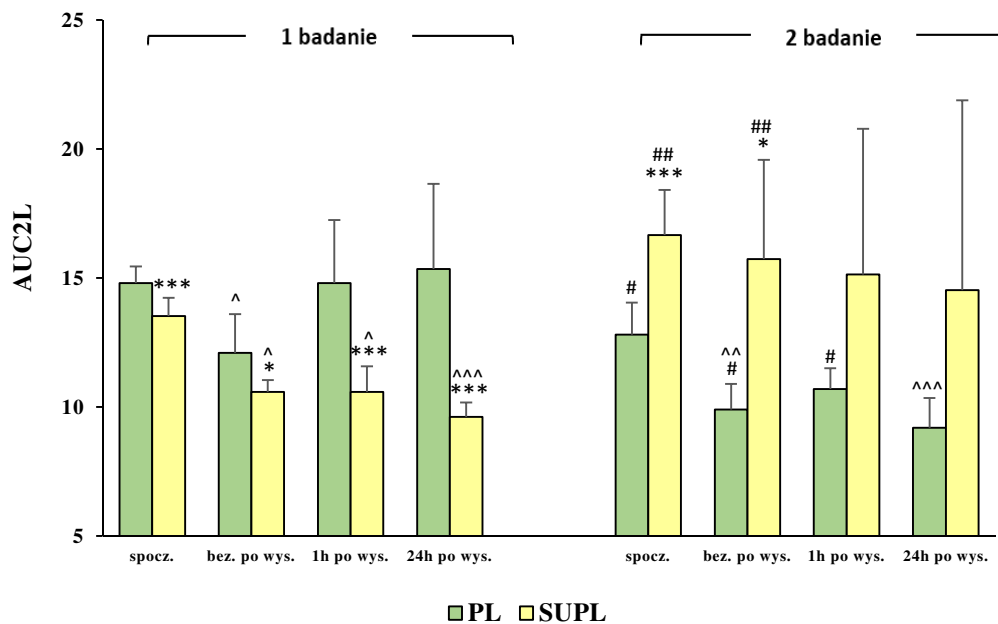
** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ – istotność różnic względem analogicznych wartości otrzymanych w grupie placebo

$p < 0.01$, ### $p < 0.001$ – istotność różnic względem analogicznych wartości otrzymanych w badaniu 1

^ $p < 0.05$, ^^ $p < 0.01$, ^^^ $p < 0.001$ – istotność różnic względem wartości spoczynkowych

* $p < 0.05$ – istotność różnic względem wartości zarejestrowanych bezpośrednio po wysiłku

B



* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ – istotność różnic względem analogicznych wartości otrzymanych w grupie placebo

$p < 0.05$, ## $p < 0.01$ – istotność różnic względem analogicznych wartości otrzymanych w badaniu 1

^ $p < 0.05$, ^^ $p < 0.01$, ^^^ $p < 0.001$ – istotność różnic względem wartości spoczynkowych

Ryc. 4.9. Napięcie mięśniowe mięśnia dwugłowego uda kończyny prawej (A) i lewej (B) po wysiłku fizycznym i suplementacji kompleksem lipidowym.

Podobnie jak w przypadku mięśnia czworogłowego w badaniu AUC2 w obu kończynach wykazano różnice międzygrupowe z istotnie wyższymi wartościami we wszystkich pomiarach w badaniu 1 oraz istotnie niższymi wartościami w pomiarze spoczynkowym i uzyskanym bezpośrednio po wysiłku w badaniu 2. W AUC2R po wykonaniu testu biegowego w grupie SUPL w badaniu 1 bezpośrednio po wysiłku zaobserwowano istotny spadek wartości AUC względem wartości spoczynkowej utrzymujący się w 1h i 24h restytucji powysiłkowej. Dodatkowo w 24h po wysiłku osiągnięte wartości były znamienne niższe od uzyskanych w 1h restytucji. W grupie PL istotne zmniejszenie AUC względem wartości spoczynkowych stwierdzono w obu badaniach bezpośrednio po wysiłku biegowym i w badaniu 2 w 24h restytucji. Po zakończonej suplementacji w grupie SUPL wykazano istotny wzrost wartości w pomiarze spoczynkowym ($p<0,01$) i uzyskanym bezpośrednio po wysiłku ($p<0,001$), a w grupie PL spadek AUC w pomiarze spoczynkowym ($p<0,001$) (**Ryc.4.9.A**).

W kończynie lewej wysiłek biegowy z przewagą skurczy ekscentrycznych wywołał podobne zmiany poziomu AUC co w kończynie prawej: ciągły istotny spadek wartości w stosunku do wartości spoczynkowej w grupie SUPL w badaniu 1 oraz znamienne obniżenie poziomu AUC względem poziomu spoczynkowego w pomiarach bezpośrednio po wysiłku w obu badaniach i w 24h restytucji powysiłkowej w badaniu 2 w grupie PL. Istotne różnice między badaniami poza tymi, które zaobserwowano w kończynie prawej stwierdzono dodatkowo w grupie PL: znamienne ($p<0,05$) spadek wartości w pomiarze bezpośrednio po wysiłku i w 1h restytucji względem analogicznych pomiarów w badaniu 1 (**Ryc.4.9.B**).

5. DYSKUSJA

5.1. Indeks kwasów tłuszczowych u biegaczy długodystansowych po suplementacji kompleksem lipidowym

Kwasy tłuszczowe zbudowane są z łańcucha węglowego, w którym liczba atomów węgla może być bardzo zróżnicowana (od 4 do 80). Powszechnie występujące w żywności kwasy tłuszczowe zawierają parzystą liczbę, najczęściej od 12 do 20 atomów (*McMurry, 2005*). Różnorodność cząsteczkowa tej grupy wynika nie tylko z długości łańcucha, ale również z położenia wiązania podwójnego w łańcuchu węglowym, z konformacji izomeru cis -trans oraz z obecności grup funkcyjnych (*Vance D. i Vance, J., 2002*). Atomy węgla w łańcuchach kwasów tłuszczowych są połączone wiązaniami pojedynczymi - kwasy tłuszczowe nasycone (NKT, *ang. saturated fatty acids – SFA*) lub podwójnymi – kwasy nienasycone (*ang. unsaturated fatty acid - UFA*), przy czym jeżeli w cząsteczce jest tylko jedno wiązanie podwójne, są to kwasy tłuszczowe mononienasycone (JNKT, *ang. monounsaturated fatty acids – MUFA*), a jeżeli więcej niż jedno wiązanie podwójne, wówczas są to kwasy wielonienasycone (*ang. polyunsaturated fatty acids – PUFA*). Pozycje występowania wiązania podwójnego w łańcuchu zwykle podaje się licząc atomy węgla od strony grupy CH₃ tzw. n- lub ω- koniec i stosując specjalny zapis metodą cyfrowo-literową określa się tzw. rodzinę (serię) kwasów tłuszczowych (np.– C18:3 n-3 oznacza: 18 atomów węgla w łańcuchu, 3 wiązania podwójne, gdzie pierwsze występuje za trzecim węglem, nazwa zwyczajowa kwas linolenowy [ALA]).

Dla organizmu ludzkiego niezbędne są nienasycone kwasy tłuszczowe, dlatego muszą być dostarczane z dietą. PUFA obecne w fosfolipidach błonowych, są odpowiedzialne za liczne funkcje komórkowe, w tym za utrzymanie struktury błony komórkowej, płynność, sygnalizację i interakcje międzykomórkowe. N-3 PUFA mogą redukować stany zapalne zmniejszając ryzyko chorób przewlekłych, takich jak choroby serca, rak i zapalenie stawów. Nazywane również „witaminą F”, regulują także ciśnienie krwi, krzepliwość krwi (działanie wazolidacyjne i antyagregacyjne EPA), tolerancję glukozy oraz rozwój i funkcje układu nerwowego (DHA) (*Wall i wsp. 2010*). Modele zwierzęce i modele komórkowe pokazują, że kwasy tłuszczowe n-3 PUFA mogą wpływać na metabolizm mięśni szkieletowych. Co więcej, ostatnie badania pokazują, że mogą wpływać nie tylko na wysiłek fizyczny i odpowiedź metaboliczną mięśni szkieletowych, ale także na odpowiedź funkcjonalną w okresie treningu wysiłkowego (*Smith i wsp. 2011, Smith i wsp. 2015*;). Zainteresowanie badaczy budzi także ich potencjalne działanie przeciwzapalne i przeciwutleniające u osób aktywnych fizycznie

u których obserwuje się zwiększoną produkcję reaktywnego tlenu (*Jeromson i wsp. 2015; Gammone i wsp. 2018*).

W badaniach będących przedmiotem niniejszej pracy dokonano oceny poziomu poszczególnych rodzajów kwasów tłuszczowych: omega-3, omega-6, SFA, MUFA, TRANS oraz wynikające z ich proporcji indeksy. Do najważniejszych z nich należą:

- Indeks omega-3 – wskaźnik poziomu zawartości kwasów: eikozapentaenowego (EPA) i dokozaheksaenowego (DHA), który koreluje z ryzykiem sercowo-naczyniowym (poziom EPA + DHA > 8% związany jest z najniższym ryzykiem nagłej śmierci sercowej);
- Indeks AA/EPA
- Indeks tłuszczów trans
- Indeks NKT/JNKT
- Poziom 22 kwasów tłuszczowych z podziałem na kwasy: nasycone (w tym miążdżycorodny kwas palmitynowy), jednonienasycone (w tym oleinowy), wielonienasycone z rodziny omega-3 (w tym EPA, DHA, alfa-linolenowy ALA) oraz omega-6 (m.in. linolowy LA, gamma-linolenowy GLA oraz arachidonowy AA).

W pracy ocenie zostały poddane wskaźniki NKT/JNT, indeks tłuszczów trans, a także indeks AA/EPA. Pierwszy z nich określa proporcje nasyconych kwasów tłuszczowych do jednonienasyconych. Kwasy tłuszczowe nasycone zawierają więcej niż 10 atomów węgla, cechą charakterystyczną jest stała konsystencja w temperaturze pokojowej, a ich źródłem są najczęściej produkty pochodzenia zwierzęcego. Nie zawierają wiązań podwójnych i dzieli się je w zależności od długości łańcucha na krótkołańcuchowe (SCFA), średniołańcuchowe (MCFA), długołańcuchowe (LCFA) i bardzo długołańcuchowe kwasy tłuszczowe (VLCFA). Poza SCFA wykazującymi właściwości prozdrowotne (ochronne działanie kwasu masłowego na jelito grube) kwasy tłuszczowe nasycone mają udowodnione działanie aterogenne i prozakrzepowe. Głównymi źródłami pokarmowymi LCFA (80–90% spożycia) są oleje kokosowy i palmowy oraz masła kakaowe, orzechowe i roślinne. Masła te są głównymi składnikami czekolady i zawierają również około 35% kwasu oleinowego. Źródłami zwierzęcymi LCFA są masło, smalec i łój wołowy, a VLCFA orzeszki ziemne i oleje roślinne. Odwrotnym działaniem charakteryzują się JNKT – jeden z podstawowych, kwas oleinowy wykazuje działanie przeciwmiażdżycowe (zwiększa stężenie HDL-C i zmniejsza stężenie LDL-C) i przeciwzakrzepowe (zmniejsza agregację płytek krwi); zmniejsza również nasilenie

układowego stanu zapalnego. Głównym źródłem pokarmowym kwasu oleinowego jest oliwa z oliwek, występuje on również w mniejszych ilościach w innych olejach roślinnych oraz w olejach z orzechów laskowych, słodkich migdałów i awokado.

Badany stosunek kwasów tłuszczowych nasyconych (NKT) do jednonienasyconych (JNKT) wpływa na płynność i przepuszczalność błon komórkowych - nadmiar kwasów tłuszczowych nasyconych usztywnia błony komórkowe zaburzając ich funkcjonowanie. To przekłada się m.in. na ryzyko chorób sercowo-naczyniowych, a z punktu widzenia przeprowadzonych badań może mieć także wpływ na efektywność dostarczania substratów energetycznych i usuwania metabolitów podczas wykonywanego wysiłku. Badaniach czynnikiem, który mógłby wpłynąć na poziom wskaźnika NKT/JNKT jest wzrost poziomu JNKT w skutek przyjmowania oliwy z oliwek, tak w grupie PL jak i SUPL. Jednak przyjmowana dawka wyniosła odpowiednio: 3200 mg w grupie SUPL i 4800 mg w grupie PL i nie wpłynęła na poziom kwasów jednonienasyconych na tyle, aby doszło do obniżenia wskaźnika NKT/JNKT. Zastanawiające jest więc, jaka ilość przyjmowanego suplementu mogłaby zmienić tę proporcję. W literaturze dotyczącej suplementacji oliwy z oliwek można znaleźć przede wszystkim informacje na temat jej wpływu na funkcjonowanie układu sercowo-naczyniowego, choć jak zauważa w obszernej metaanalizie Schwingshacki i wsp. (2015) ze względu na dużą heterogeniczność eksperymentów - w tym właśnie dawkę i sposób podawania JNKT - brak jest powtarzalności wyników. Wykazano wpływ suplementacji oliwą na obniżenie poziomu biomarkerów białkowych choroby wieńcowej (Silva i wsp. 2015), ryzyka wystąpienia niektórych chorób nowotworowych i zaburzeń kognitywnych (Visioli i wsp. 2018).

Badania dotyczące suplementacji oliwą z oliwek osób aktywnych fizycznie najczęściej dotyczą jej wpływu na parametry wydolnościowe co jednak może mieć związek również z zawartymi w oliwie polifenolami (Boss i wsp. 2010, Capo i wsp. 2016(a), Gorzynik-Debicka i wsp. 2018). Mniej danych jest natomiast o samym wpływie spożycia JNKT na ogólny poziom kwasów nienasyconych we krwi. Interesujące badania przeprowadziła Esquiú i wsp. (2019) analizując bezpośredni wpływ przyjęcia oliwy z oliwek na godzinę przed wysiłkiem o różnej intensywności na tzw. koordynację sercowo-oddechową (CRC, ang. *cardiorespiratory coordination*) - dawka 25 ml istotnie wpłynęła na parametry sercowe i oddechowe jedynie przy wysiłku o umiarkowanej intensywności. Z kolei Capo i wsp. (2016) wykazali wpływ miesięcznej suplementacji oliwą z oliwek i oleju z migdałów na obniżenie poziomu nasyconych kwasów tłuszczowych w osoczu, co jednak nie miało wpływu na badane parametry wydolnościowe podczas maksymalnego wysiłku.

Kolejnym badanym wskaźnikiem był indeks tłuszczów trans. Kwasy tłuszczowe typu trans (TFA – ang. *trans fatty acids*) posiadają co najmniej jedno wiązanie podwójne pomiędzy atomami węgla. Od naturalnie występujących nienasyconych kwasów różnią się położeniem atomów wodoru względem łańcucha węglowego: w konfiguracji „cis” charakterystycznej dla UFA atomy wodoru leżą po tej samej stronie łańcucha węglowego, a cząsteczka kwasu wygina się na kształt litery „V”, natomiast w konfiguracji trans atomy wodoru leżą po przeciwnych stronach łańcucha węglowego, który ma prostą strukturę, podobną do tej, jaka występuje w kwasach tłuszczowych nasyconych (Żbikowska, 2010). Źródłem TFA są procesy technologiczne: uwodornienie i rafinacja, którym poddawane są nienasycone kwasy tłuszczowe, głównie oleje roślinne, a także w procesie dezodoryzacji (jednego z etapów procesu rafinacji) olejów zawierających dużą ilość PUFA oraz ogrzewania olejów do zbyt wysokich temperatur (>200°C). Wykorzystywane są do produkcji twardych margaryn, jako tłuszcze smażalnicze stosowane w gastronomii i tłuszcze cukiernicze. W licznych badaniach potwierdzono, że spożywanie TFA wiąże się z rozwojem chorób układu sercowo-naczyniowego (Mozzaffarian i wsp. 2006, Wang i wsp. 2012) TFA wywołują niekorzystne zmiany profilu lipidowego – podnoszą stężenie cholesterolu LDL, obniżają stężenie cholesterolu HDL i zwiększają stosunek całkowitego cholesterolu do cholesterolu HDL (Dyerberg i wsp. 2004). Powodują też wzrost stężenia biomarkerów stanu zapalnego (np. białko C-reaktywne) we krwi, pogarszają funkcję nabłonka, obniżają wrażliwość na insulinę oraz stopień jej wydzielania. U ciężarnych zaburzają rozwój płodu i zmniejszają stopień wysycenia jego tkanek przez NNKT (Dorfmann i wsp. 2009; Mozzaffarian i wsp. 2009). Biorąc pod uwagę wspomniany wpływ PUFA i regularnie podejmowanej aktywności fizycznej, to właśnie te dwa czynniki mogą ograniczyć niekorzystne efekty działania TFA, nie mając jednak wpływu na sam poziom tych tłuszczów we krwi. W niniejszej pracy indeks tłuszczów TRANS grupie suplementowanej nie uległ zmianie. Zastanawiający jest natomiast istotny wzrost poziomu TFA w grupie PL, zwłaszcza, że czynnikiem podwyższającym poziom tłuszczów TRANS jest ich spożycie, a badani przez cały okres trwania doświadczenia byli objęci reżimem dietetycznym.

Ostatnim analizowanym indeksem był wskaźnik AA/EPA. Kwas eikozapentaenowy (EPA) wraz z kwasem dokozaheksaenowym (DHA) są podstawowymi kwasami wielonienasyconymi z grupy omega-3. Kwasy tłuszczowe PUFA będące długołańcuchowymi, wielonienasyconymi kwasami tłuszczowymi, należą do czterech rodzin: n-3 i n-6 oraz n-9 i n-7, z czego kwasy z rodzin n-7 i n-9 mogą być syntetyzowane przez organizmy ssaków, a kwasy z rodzin n-3 i n-6 są kwasami egzogennymi, których tkanki

człowieka ze względu na brak odpowiednich układów enzymatycznych nie są w stanie syntetyzować. Te dwie, istotne biologicznie rodziny określane są jako niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe (NNKT). Ich formy macierzyste muszą być dostarczone z pokarmem (przez łożysko, z mlekiem matki lub jako składnik diety dla osobników dorosłych) a są to odpowiednio kwas linolowy (LA, ang. *Linoleic Acid*) dla omega-6 i kwas α -linolenowy (ALA, ang. *Alpha Lipoic Acid*) dla omega-3. Oba macierzyste kwasy tłuszczowe mają analogiczne ścieżki reakcyjne katalizowane przez te same enzymy, desaturazy i elongazy, dzięki którym na skutek stopniowej elongacji oraz desaturacji (wprowadzenia dodatkowego wiązania podwójnego), powstają nowe kwasy tłuszczowe (Vance i Vance, 2002): z ALA kwas dokozaheksaenowy i eikozapentaenowy, a z LA kwas arachidonowy (AA). Niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe uwalniane z fosfolipidów stają się prekursorami wewnątrzustrojowej syntezy eikozanoidów, substancji hormonopodobnych o szerokim spektrum działania takie jak protaglanyny (PG), prostacykliny (PGI), tromboksany (TX) oraz leukotrieny. W zależności od ścieżki reakcyjnej różnią się jednak one między sobą funkcjami biologicznymi i często wykazują przeciwstawne działanie, dlatego też bardzo ważna jest odpowiednio zbilansowana ilość obu grup kwasów w diecie. Stosunek NNKT n-6 do n-3 powinien wynosić mniej niż 5:1, a za optymalne przyjmuje się nawet 2:1 (Wertz, 2009). Eikozanoidy powstałe z AA już w małych ilościach wykazują wysoką aktywność biologiczną i mogą wykazywać działanie prozakrzepowe oraz prozapalne, a także wpływać na skurcz naczyń krwionośnych. Eikozanoidy, które powstają z NNKT n-3, wykazują działanie przeciwwzakrzepowe, przeciwwzapalne oraz wazodylatacyjne (Simopoulos, 2011). Ze względu na działanie kwasu AA indeks AA/EPA nazywany jest wskaźnikiem przewlekłego stanu zapalnego i określa stosunek najbardziej prozapalnego kwasu arachidonowego (AA, omega-6) do kwasu eikozapentaenowego (EPA, omega-3) mającego działanie antyzapalne. To, co wydaje się istotne z punktu widzenia przeprowadzonych badań to także ewentualna zmiana proporcji AA do EPA w skutek wzrostu poziomu EPA: omega-3 PUFA są ligandami receptorów aktywowanych przez proliferatory peroksysomów (PPAR- α) i wywierają liczne plejotropowe działania w aspekcie wpływu na metabolizm lipidów i energii. Indukują również ekspresję białka rozprzegającego (UCP) i zwiększają gęstość mitochondriów, przez co stymulują proces β -oksydacji wolnych kwasów tłuszczowych w mięśniach (Flachs i wsp. 2005).

W niniejszym badaniu zastosowana suplementacja istotnie wpłynęła na obniżenie wskaźnika AA/EPA, prawdopodobnie w większym stopniu w skutek podniesienia poziomu EPA niż obniżenia AA. Większy wpływ zaobserwowano w grupie SUPL, co znajduje oczywiste uzasadnienie biorąc pod uwagę skład podawanego suplementu: dzienna dawka EPA

w grupie SUPL wynosiła 232 mg. Wspomniano już, że kwasy EPA i AA mając podobną strukturę konkurują ze sobą w reakcji powstawania czynników zapalnych (prostaglandyn i leukotrienów), zatem im więcej EPA tym bardziej ograniczona jest funkcja AA w rozwijaniu reakcji zapalnej równiej tej wywołanej w skutek intensywnego wysiłku. Bloomer i wsp. (2009) wykazali, że suplementacja EPA / DHA zwiększa poziom tych kwasów tłuszczowych we krwi i powoduje zmniejszenie spoczynkowego poziomu biomarkerów stanu zapalnego u mężczyzn regularnie uprawiających aktywność fizyczną. Martorell i wsp. (2014) w badaniach na piłkarzach podają dokładną dawkę (1,14g/d), która przyjmowana przez osiem tygodni poprawia profil lipidowy ze zwiększeniem PUFA. i poziomu krążącej prostaglandyny E2 (PGE2) w osoczu. Wpływ zwiększonej podaży EPA i DHA budzi niezmiennie duże zainteresowanie badaczy sportowych zajmujących skrajnie różniącymi się dyscyplinami. Potwierdzono pozytywne oddziaływanie EPA na wydolność tlenową (Żebrowska i wsp. 2015, Gravina i wsp. 2016, Hingley i wsp. 2017) z istotną poprawą parametrów oddechowych (Mickleborough i wsp. 2003) i wpływ omega-3 na parametry siłowe. Ten ostatni, ograniczony u sportowców (Gravina i wsp. 2016, McGlory i wsp. 2016), wydaje się szczególnie ważny w kontekście pourazowej odbudowy masy mięśniowej, a także jej utrzymania u starszych populacji dorosłych w wyniku anabolicznej roli omega-3 PUFA (McGlory i wsp. 2019; Philpott i wsp. 2019). Należy jednak podkreślić, że duża liczba badań implikuje znaczne rozbieżności dotyczące dawkowania, okresu i sposobu przyjmowania PUFA i : wciąż nie jest jasne czy sportowcy powinni stosować suplementację, zamiast włączać do diety tłuste ryby jako źródło kwasów tłuszczowych omega-3 (Rawson i wsp. 2018). Najczęściej skuteczność działania EPA ocenia się na podstawie poprawy badanych parametrów czy wskaźników określonych dyscyplin bez oznaczania poziomu konkretnych kwasów we krwi. Zastosowane w pracy nowatorskie podejście, wykorzystujące badanie krwi do oznaczenia indeksu kwasów tłuszczowych we krwi przed i po suplementacji mogłoby okazać się pomocne w ustaleniu dawki niezbędnej do osiągnięcia efektu w postaci poprawy konkretnego parametru.

5.2. Równowaga prooksydacyjno-antyoksydacyjna po wysiłku biegowym u biegaczy długodystansowych suplementowanych kompleksem lipidowym

W optymalnych warunkach homeostazy w organizmie człowieka ma miejsce równowaga pomiędzy reakcjami o charakterze prooksydacyjnym, a możliwościami obrony antyoksydacyjnej. Stan, zaburzonej równowagi prooksydacyjno-antyoksydacyjnej określany jest terminem „stres oksydacyjny” (Sies, 1985). Dochodzi do niego między innymi podczas wysiłku fizycznego, gdy dopływ tlenu jest znacznie zwiększony, jego utylizacja przez pracujące mięśnie może wzrosnąć nawet 100-krotnie, a produkcja anionorodników ponadtlenkowych może zwiększyć się kilkudziesięciokrotnie. Obecnie wiadomo, że niski lub umiarkowany poziom oksydantów powstałych w trakcie aktywności fizycznej korzystnie wpływa na wytrzymałość i generowanie siły mięśniowej. Liczne badania wykazały, że RONS powstałe podczas umiarkowanego wysiłku fizycznego są konieczne do wywołania zmian adaptacyjnych do wysiłku tlenowego i poprawy endogennych możliwości obronnych organizmu (Gomez-Cabrera i wsp. 2008). Oprócz wielkości zaaplikowanego stresu wysiłkowego na odpowiedź adaptacyjną ma wpływ również poziom wyjściowy czynników antyoksydacyjnych i to od niego w dużym stopniu będzie zależeć efektywność treningu i regeneracji powysiłkowej (Powers i wsp. 2011).

Mając na uwadze złożoność systemu obrony antyoksydacyjnej organizmu w badaniu poddano ocenie kilka najbardziej reprezentatywnych enzymów antyoksydacyjnych: aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), katalazy (CAT), peroksydazy glutationowej (GPx), zmiany stężenia zredukowanego glutationu (GSH) uznawanego za główny niskocząsteczkowy antyoksydant nieenzymatyczny występujący we krwi. Do oceny stresu oksydacyjnego wykorzystano stężenie dialdehydu malonowego (MDA) uznawanego za marker peroksydacji lipidów.

Najważniejszym enzymem pierwszej linii obrony antyoksydacyjnej jest dysmutaza ponadtlenkowa (SOD). Kluczowa jest jej rola w rozkładzie anionorodnika ponadtlenkowego (H_2O_2) do nadtlenku wodoru w przestrzeni pozakomórkowej – pozostałe enzymy, CAT i GPx dezaktywują H_2O_2 głównie wewnątrz komórki. Ma to szczególne znaczenie w zachowaniu homeostazy układu naczyniowego i wskazuje, że SOD oprócz redukcji śródmięzszowego O_2 , zmniejsza również ilość nadtlenku wodoru (Landmesser i Drexler, 2002; Zheng, 2003). Liczne prace (Gomez-Cabrera i wsp. 2008; de Sousa i wsp. 2017) wykazały, że reaktywne formy tlenu (ROS) są nie tylko toksyczne, ale także odgrywają istotną rolę w sygnalizacji komórkowej i regulacji ekspresji genów.

W niniejszych badaniach wykazano istotny wzrost poziomu SOD w grupie SUPL bezpośrednio po wysiłku. W pierwszej godzinie po wysiłku wartość wskaźnika była istotnie wyższa w obu grupach, jednak po suplementacji kompleksem lipidowym obserwowana różnica była większa. Brak natomiast różnic pomiędzy wartościami spoczynkowymi zarówno przed jak i po okresie suplementacji, co zgodne jest z wynikami badań Buonocore i wsp. (2019). Badali oni wpływ suplementacji omega-3 w ilości 4g/d przez osiem tygodni w dwóch grupach: grupa biegaczy (biegi średnio i długo dystansowe) i grupa prezentująca sedenteryjny tryb życia.

CAT i GPx są enzymami synergistycznymi, które wewnątrz komórki unieczynniają H₂O₂ do postaci wody. Różnica pomiędzy ich działaniem polega na tym, że CAT charakteryzuje się znacznie niższym w porównaniu do GPx powinowactwem do nadtlenu wodoru, co umożliwia katalizowanie rozkładu H₂O₂ tylko przy wyższych stężeniach tego enzymu (Gaetani i wsp. 1989).

W przeprowadzonych badaniach brak jest istotnych różnic dotyczących GPx. Zwraca jednak uwagę widoczny na rycinie ogólny wzrost poziomu enzymu w obu grupach po okresie suplementacji, a także charakterystyczny dla grupy SUPL jest wzrost poziomu GPx bezpośrednio po wysiłku, gdzie przed okresem suplementacji, a także po tym okresie w grupie PL dochodziło do obniżenia aktywności GPx w stosunku do wartości spoczynkowych.

Z kolei wyniki CAT prezentują znaczne obniżenie wartości spoczynkowych enzymu ($p \leq 0,01$) w grupie SUPL po zakończonej suplementacji. Wzrost aktywności enzymu względem wartości sprzed suplementacji zarejestrowano dopiero w pierwszej i 24 godzinie po wysiłku. Nie był to wzrost istotny, ale charakteryzował wyłącznie grupę przyjmującą kompleks lipidowy. Dla porównania w badaniu Buonocore i wsp. (2019) wykazano, że suplementacja PUFA poprawia spoczynkową aktywność GPx i CAT zarówno u sportowców, jak i osób prowadzących siedzący tryb życia. Zaobserwowano również wzrost poziomu SOD w obu grupach, choć nie był on istotny statystycznie. Z kolei w badaniu Ghiasvand i wsp. (2010) przeprowadzonych na irańskich koszykarzach przyjmowanie przez sześć tygodni EPA w dawce 2g/dnie przyniosło zmian w poziomie CAT.

Głównym przedstawicielem drugiej linii obrony antyoksydacyjnej krwi jest nieenzymatyczny, endogeny zredukowany glutation (GSH). Glutation poza „zmiataniem” ROS bierze udział w regeneracji innych antyoksydantów i uszkodzonych składników komórki, głównie białek i lipidów błon komórkowych oraz DNA (Pastore i wsp. 2003). Oprócz tego związek pomaga w utrzymaniu prawidłowego potencjału redoks komórek, co ma z kolei wpływ na regulację wewnątrzkomórkowego metabolizmu w procesach wzrostu i różnicowania się komórek oraz w procesie apoptozy (Bliska i wsp. 2007). Wyniki przeprowadzonych badań

wykazują obniżenie poziomu GSH w grupie SUPL po okresie przyjmowania kompleksu lipidowego, z istotnie niższymi wartościami w spoczynku i w 24 godzinie po wysiłku, co może wskazywać na wykorzystanie tego antyoksydanta jako zmiatacza wolnych rodników.

Wzrost RONS podczas intensywnego wysiłku fizycznego zwiększa tempo utleniania wielonienasyconych kwasów tłuszczowych budujących błony biologiczne, co prowadzi do powstania nadtlenków tych związków. Proces ten ma charakter lawinowy (*Deaton i Malin, 2003; Ebele i wsp. 2016*), a powstałe na drodze peroksydacji produkty końcowe zmieniają właściwości fizyczne błon komórkowych (obniżenie hydrofobowości lipidowego wnętrza błon komórkowych) i strukturę podwójnej warstwy lipidowej (zaburzenia asymetrii lipidowej błon) (*Niki i wsp. 2005*). Jednym z końcowych produktów peroksydacji lipidów jest dialdehyd malonowy (MDA), którego poziom może świadczyć właśnie o wielkości stresu oksydacyjnego indukowanego wysiłkiem fizycznym (*Leaf i wsp. 1997; Spirlandeli i wsp. 2014*). MDA wykazuje właściwości cytotoksyczne, mutagenne i rakotwórcze (*Całyniuk i wsp. 2016*), a do oznaczenia jego poziomu w surowicy krwi wykorzystuje się jego zdolność do tworzenia barwnego kompleksu z kwasem tiobarbiturowym.

W niniejszym badaniu zarejestrowano wyższy poziom MDA po okresie suplementacji zarówno w obu grupach, z tym że większe różnice istotne statystycznie dotyczyły grupy PL. W grupie przyjmującej kompleks lipidowy jedynie w pierwszej godzinie po wysiłku wzrost MDA był istotnie większy w stosunku do pomiaru wykonanego przed rozpoczęciem suplementacji. W cytowanych już badaniach na koszykarzach (*Ghiasvand i wsp. 2010*) wykazano, że suplementacja EPA podwyższa spoczynkowy poziom MDA w osoczu. W innych badaniach przeprowadzonych na zawodnikach judo zarejestrowano wzrost MDA po suplementacji (6 tygodni, 600 mg EPA, 400 mg DHA) zarówno w spoczynku jak i po treningu (*Filare i wsp. 2010*). Przeciwnie wyniki prezentuje w swojej pracy również cytowana wcześniej Buonocore i wsp. (2019): wykazała ona, że średnie wartości MDA znacznie spadły po suplementacji zarówno u sportowców, jak i osób prowadzących siedzący tryb życia: zmienność była większa u sportowców niż u osób siedzących w grupie kontrolnej.

Podsumowując wyniki wybranych wskaźników równowagi prooksydacyjno-antyoksydacyjnej po wysiłku biegowym należy zaznaczyć, że obecnie niewiele jest dostępnych publikacji, które prezentują wyniki enzymów obrony antyoksydacyjnej u suplementowanych kwasami omega sportowców, w szczególności biegaczy długodystansowych, u których przeprowadzono pomiary po wykonanym wysiłku. Pewne informacje, do których można się odnieść, pochodzą z badań Gray i wsp. (2014): badacze wykazali, że w grupie suplementowanej rybim olejem po intensywnym wysiłku jakim jest wykonanie 200 powtórzeń ekscentrycznego

zgięcia kolana doszło do obniżenia się wskaźników stresu oksydacyjnego w porównaniu do grupy placebo. Badani byli osobami uprawiającymi sport na poziomie rekreacyjnym, a badane wskaźniki (m.in. nadtlenuk wodoru) nie były tożsame z badanymi w niniejszej pracy. U innych aktywnych fizycznie mężczyzn biomarkery markery stresu oksydacyjnego wzrosły nieznacznie po wysiłku jakim był 60 minutowy test wspinaczki na bieżni z dodatkowym obciążeniem w postaci plecaka. Autorzy tych badań (*Bloomer i wsp. 2009*) zwracają jednak uwagę na kwestię doboru testu dla sportowców, który miałby indukować ewentualne zmiany. Według autorów fakt, że suplementacja EPA/DHA znacząco zwiększa poziom tych kwasów tłuszczowych, nie jest jednoznaczny z obniżeniem stresu oksydacyjnego lub stanu zapalnego wywołanego wysiłkiem fizycznym w grupie mężczyzn wytrenowanych. Może to wynikać z obserwacji, że wytrenowani mężczyźni wykazują minimalny wzrost zarówno stanu zapalnego, jak i stresu oksydacyjnego w odpowiedzi na umiarkowany czas trwania ćwiczeń aerobowych (*Fisher-Wellman i Bloomer 2009*). Odpowiedź na ostry wysiłek analizowali *Capó i wsp. (2015)*. Obszerne badania dotyczyły zmian wskaźników obrony antyoksydacyjnej i uszkodzeń peroksydacyjnych u piłkarzy przyjmujących 1,16 g DHA przez 8 tygodni cyklu treningowego. Wykazano poprawę zdolności antyoksydacyjnych: suplementacja zwiększyła aktywność katalityczną SOD i spowodowała zmniejszenie uszkodzeń nadtlenukowych zarówno w spoczynku jak i wywołanych ostrym wysiłkiem fizycznym (jednorazowy, intensywny trening). Inne publikacje, do których odniesiono się w niniejszej pracy dotyczą sportowców różnych dyscyplin, ale pomiary mające wykazać wpływ suplementacji najczęściej dotyczyły wartości spoczynkowych. Bazując na obszernej metaanalizie zbierającej aktualne dane dotyczące suplementacji kwasami omega-3 (*Heshmati i wsp. 2019*) można by przyjąć, że są one czynnikiem wzmacniającym obronę przeciwutleniającą i poprawiającym status antyoksydacyjny, a wskaźnikami, które najczęściej ulegają poprawie są MDA, TAC i aktywność GPx. Przegląd ten dotyczył jednak bardzo zróżnicowanych grup, z których część składała się z osób zdrowych, część dotyczyła osób z różnymi schorzeniami, a jeszcze inna sportowców różnych dyscyplin. Określenie związku między suplementacją długołańcuchowych WNK n-3 bogatych w EPA i DHA a wysiłkiem fizycznym jakim są biegi długodystansowe, obserwując prawdopodobne zmiany markerów profilu lipidowego, statusu oksydacyjnego i antyoksydacyjnego oraz stanu zapalnego u sportowców było przedmiotem jedynie pracy *Buonocore i wsp. (2019)*.

5.3. Stan funkcjonalny błon komórek mięśni szkieletowych po wysiłku biegowym u biegaczy długodystansowych suplementowanych kompleksem lipidowym

Metodą powszechnie stosowaną w bieżącej biochemicznej kontroli treningu jest obserwacja zmian aktywności białek enzymatycznych w osoczu krwi, najczęściej kinazy kreatynowej (CK) i dehydrogenazy mleczanowej (LDH), (Sjogren, 2007; Callegari i wsp. 2017). Przyczyną zwiększonego uwalniania białek komórkowych do krwiobiegu jest wzrost przepuszczalności błon komórkowych w skutek ich mechanicznego uszkodzenia lub modyfikacji oksydacyjnych w obrębie ich struktur. Dynamika zmian aktywności enzymów komórkowych w osoczu nie jest identyczna, zależy bowiem od tempa ich przenikania z limfy do krwi (Sjogren, 2007; Callegari i wsp. 2017).

CK odgrywa bardzo ważną rolę w homeostazie komórkowego ATP, który jest regenerowany z wysokich zasobów fosfokreatyny w wyniku odwracalnej reakcji katalizowanej przez CK (Teixeira i Borges, 2012). W osoczu najczęściej oznacza się aktywność kinazy kreatynowej, która w ponad 95% związana jest z izoformą występującą w mięśniach szkieletowych (CK-MM).

W diagnostyce enzymologicznej duże znaczenie zyskała również dehydrogenaza mleczanowa, która katalizuje ostatni etap szlaku glikolitycznego – przejście pirogronianu w mleczan i odwrotnie (Markert, 1984). LDH jest ważnym enzymem metabolizmu glukozy, funkcjonującym jako tetramer złożony z dwóch podjednostek: mięśniowej - M i sercowej – H. Jej znaczna aktywność ma miejsce w prawie każdej tkance, szczególnie w mięśniach szkieletowych, wątrobie, sercu, nerkach, mózgu, płucach i erytrocytach. Istnieje pięć izoenzymów, a ich rozkład tkankowy odzwierciedla wymagania metaboliczne tkanek. Ekspresja podjednostki M jest przystosowaniem do wzmożonego dostarczania energii z wykorzystaniem beztlenowej glikogenolizy, ponieważ te izoenzymy mają maksymalną aktywność przy wysokich stężeniach pirogronianu. Z kolei w chronicznie obciążonych mięśniach szkieletowych dochodzi do ekspresji LDH-1 i LDH-2, izoenzymów z przewagą podjednostek H. Dodatkowo wolnokurczliwe włókna mięśni szkieletowych wykazujące względnie stały stan aktywności tonicznej i mają właśnie wzór izoenzymu LDH podobny do mięśnia sercowego, w którym przeważa LDH-1 (35-70% całkowitej aktywności LDH) (Sorichter i wsp. 1999).

Innym markerem uszkodzenia mięśni jest przedostająca się do krwi, między innymi w skutek intensywnego wysiłku, mioglobina (Mb). Mb jest niskocząsteczkowym białkiem hemowym wiążącym tlen mięśni poprzecznie prążkowanych, uwalnianym do krwiobiegu

natychmiast po uszkodzeniu mięśnia. Ułatwia dyfuzję tlenu w komórkach mięśni i służy jako rezerwar tlenu we włóknach mięśniowych. Jest obecna tylko w mięśniach poprzecznie prążkowanych (szkieletowych i typu sercowego) gdzie stanowi około 5-10% wszystkich białek cytoplazmatycznych. Jest umiejscowiona w pobliżu sarkolemy, aparatu kurczliwego i wewnątrzkomórkowych struktur błoniastych lub włóknistych (*Sorichter i wsp. 1999*). W mięśniach szkieletowych najwięcej Mb zawierają włókna wolnokurczliwe (ST). Stężenie mioglobiny we krwi odzwierciedla stopień uszkodzenia mięśni. W związku z tym badanie poziomu Mb znalazło zastosowanie w sporcie, w kontroli treningu i procesów regeneracji powysiłkowej. Najczęściej mierzonymi markerami uszkodzeń mięśni są właśnie CK, LDH i Mb, z czego Mb na ogół pozwala na najwcześniejsze wykrycie uszkodzeń. Dla CK i Mb charakterystyczna jest wysoka czułość, ale niestety niska swoistość badania - żadne z tych białek nie jest specyficzne dla mięśni szkieletowych, ponieważ są obecne w stosunkowo wysokich stężeniach również w mięśniu sercowym (są więc uwalniane do osocza np. po zawale mięśnia sercowego). Ponieważ jednak jak dotąd brak ściśle określonego białka markerowego uszkodzenia mięśni szkieletowych badanie stosuje się w rutynowej analizie biochemicznej krwi zawodników (*Nieman i wsp. 2016, Rodrigues i wsp. 2016*)

Ostatnim analizowanym białkiem uszkodzenia mięśni była troponina. Jej kompleks występuje w mięśniach prążkowanych i odpowiada za regulację pracy włókien mięśniowych za pośrednictwem jonów wapnia. Zawiera trzy polipeptydy: troponina t (TnT), troponina I (TnI) i troponina C (TnC). TnT jest białkiem asymetrycznym z globularną domeną C-końcową. Ma miejsce wiązania dla tropomiozyny i przyjmuje się, że jest odpowiedzialna za wiązanie kompleksu troponiny z tropomiozyną, tym samym umieszczając kompleks na cienkich nitkach. Troponina I jest białkiem globularnym zapobiegającym skurczom przy braku wapnia i TnC poprzez hamowanie ATPazy aktomiozyny, tym samym blokując ruch miozyny. Troponina C jest białkiem w kształcie hantli z dwiema domenami kulistymi połączonymi długą centralną helisą. Polipeptyd ten wiąże wapń i odpowiada za regulację procesu aktywacji cienkich włókien podczas skurczu.

W strukturze mięśni można wyróżnić kilka form białek kurczliwych pochodzących z odmiennych genów i różniących się położeniem w tkankach (np. mięsień szkieletowy szybko kurczliwy i mięsień sercowy). Tak zwane izoformy są specyficzne dla poszczególnych tkanek, mogą więc być wykorzystywane jako markery określonych typów mięśni w ich diagnostyce. Powszechnie jest wykorzystywane testów opartych na badaniu poziomu troponin sercowych (sercowa troponina I (cTnI) i / lub cTnT) w diagnostyce zawału mięśnia sercowego (MI), a także w diagnostyce i leczeniu niestabilnej dławicy (*Alpert i wsp. 2000*). Znacznie mniej uwagi poświęcono opracowaniu odpowiednika dla zaburzeń mięśni szkieletowych, gdzie częstszym markerem surowicy, mimo swojej niespecyficzności tkankowej i niemożności ujawnienia uszkodzeń określonych typów włókien szkieletowych (szybko lub wolno kurczliwych) pozostaje CK.

Biorąc pod uwagę fakt, że peroksydacja lipidów błonowych jest jednym z głównych czynników odpowiedzialnym za zwiększenie przepuszczalności błon komórkowych, konsekwencją czego jest „ucieczka” enzymów komórkowych do przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Oceny stanu funkcjonalnego błon komórek komórkowych można dokonać właśnie na podstawie zmian aktywności opisanych markerów: CK, LDH, Mb i TnT.

W niniejszych badaniach w przypadku CK, LDH i TnT nie stwierdzono wyraźnego wpływu trzytygodniowej suplementacji kompleksem lipidowym na ich poziom w surowicy krwi. W grupie SUPL zaobserwowano podobne wartości CK przed i po suplementacji. Brak wpływu suplementacji EPA/DHA na powysiłkowy poziom CK niezależnie od zaaplikowanego wysiłku wykazali m.in. Lenn i wsp. (2002), Phillips i wsp. (2003), Houghton i Onambele (2012), Gray i wsp. (2014), Tsuchiya i wsp. (2016) i Kyriakidou i wsp. (2021). W badaniach tych dawka maksymalna dawka suplementu wynosiła 3 g/d przez 4 tygodnie (*Kyriakidou i wsp. 2021*), a badani byli zdrowymi osobami nie uprawiającymi regularnie sportu. Z kolei Tartibian i wsp. (2011) i DiLorenzo (2012) i Mickleborough i wsp. (2015) wykazali efektywne działanie suplementacji na aktywność CK, również u zdrowych, nietreningujących mężczyzn. Co ciekawe dawka wystarczająca do wywołania efektu wynosiła 0,54 g/d i była podawana przez 30 dni (*Tartibian i wsp. 2011*). W przypadku osób aktywnych fizycznie obniżenia CK w surowicy nie zaobserwowano u sportowców po jednorazowej suplementacji (EPA 0.75 g, DHA 0.05 g) (*Jakeman i wsp. 2017*), a także po najwyższej zaproponowanej dawce (4.432 g/d przez 6 tygodni) u osób uprawiających sport na poziomie rekreacyjnym (*Bloomer i wsp. 2009*). Zastanawiająco wysoką wartość osiągnięto w 24 godzinie po wysiłku w grupie PL przed rozpoczęciem suplementacji. Istotnego wzrostu w stosunku do pozostałych pomiarów z badania 1, a także istotnie wyższej wartości niż ta z 24 godziny po wysiłku po suplementacji nie

zaobserwowano w grupie SUPL. Tymczasem w innych badaniach przeprowadzonych na grupie sportowców różnych dyscyplin wytrzymałościowych suplementowanych kompleksem lipidowym (600 mg/d PCSO-524® przez 8 tygodni) wartość pomiaru z 24 godziny w obu grupach zarówno przed jak i po suplementacji istotnie wzrastała w stosunku do pomiaru spoczynkowego, z tym że w grupie suplementowanej wzrost ten był mniejszy (*Pumpa i wsp. 2011*). Takiego efektu nie zaobserwowano w niniejszych badaniach.

Podobnie w przypadku LDH nie zaobserwowano istotnych różnic wynikających z suplementacji. Dla obu grup pomiar w spoczynku i bezpośrednio po wysiłku przyjmuje podobne wartości przed i po suplementacji. W grupie SUPL charakterystyczny (ale nie istotny) jest wysoki poziom enzymu w następnych pomiarach (godzinę i 24 godziny po wysiłku), w stosunku do grupy PL i pomiarów wykonanych przed suplementacją. W przytoczonych wcześniej badaniach, poziom LDH monitorował jedynie Tartibian i wsp. (*2011*). Po 40-minutowym steppingu, grupa eksperymentalna wykazała istotny trend w kierunku zmniejszenia stężenia LDH w osoczu natychmiast, 24 i 48 godzin po wysiłku.

Brak jest również wyraźnych różnic poziomie TnT w obrębie grupy SUPL przed i po przyjmowaniu kompleksu lipidowego. W obu grupach stężenia powysiłkowe TnT przyjmują niższe wartości po zakończonej suplementacji, jednak nie są to zmiany istotne. Istotne obniżenie poziomu sTnI wykazał natomiast Mickleborough i wsp. (*2015*). Ponieważ w jego i niniejszych badaniach zastosowano ten sam protokół wysiłkowy, a także rodzaj i dawkę suplementu (1200 mg/d kompleksu lipidowego), kluczowy wpływ na wielkość efektu działania suplementacji wydaje się mieć poziom wytrenowania badanych – u Mickleborougha i wsp. (*2015*) byli to nietreningujący mężczyźni, a w badaniach będących przedmiotem pracy - ultramaratończycy.

Uwagę zwracają natomiast wyniki Mb, a dokładnie różnice wartości między badaniami przed i po suplementacji w grupie SUPL. Zaobserwowano znamienne niższe stężenia Mb bezpośrednio ($p \leq 0,05$) i w 24 godzinie po wysiłku ($p \leq 0,01$). Dodatkowo w grupie SUPL po zakończonej suplementacji po osiągnięciu najwyższej wartości Mb bezpośrednio po wysiłku dochodziło do stopniowego obniżenia poziomu markera (również w 24 godzinie po wysiłku) czego nie zaobserwowano w grupie PL. Wydaje się interesującym, że w różnych badaniach, w których mierzono poziom Mb, jej najwyższa wartość występowała w różnych momentach tj: u Mickleborougha i wsp. (*2015*) była to 72 godzina, a u Pumpy i wsp. (*2011*) 4 godzina po wysiłku. Generalnie niższy poziom Mb w wyniku suplementacji wykazali Tartibian i wsp. (*2011*) i Mickleborough i wsp. (*2015*), z tym że istotne różnice między grupami, a także w stosunku do wartości wyjściowych zaobserwowali oni dopiero w pomiarze z 24 godziny

i kolejnych. W przeciwieństwie do nich Tsuchiya i wsp. (2016) nie wykazali istotnych zmian poziomu Mb w wyniku przyjmowania dawki 0,86 g/d przez 8 tygodni.

Podsumowując wyniki poziomu markerów uszkodzenia mięśni po suplementacji kompleksem lipidowym można przyjąć, że jedną z możliwych przyczyn niespójnych wyników dotyczących ich zmian pod wpływem suplementacji są duże różnice w typie ćwiczeń. Wydaje się, że rodzaj skurczu i dobór obciążenia, oraz to ile razy mięsień będzie „narażony” na taki wysiłek nawet bardziej niż wytrenowanie badanych, czy wielkość dawki przyczynia się do tak odmiennych wyników. Biorąc pod uwagę właśnie kryterium doboru ćwiczeń, najbardziej podobny do niniejszych protokołów badań przeprowadził cytowany wielokrotnie Mickleborough i wsp. (2015), a także Kyriakidou i wsp. (2021). Ci ostatni zaaplikowali podobnie wymagający wysiłek (60 min, 65% VO_{2max} , - 10% gradient) i wysoką dawkę suplementu (3g/d przez 30 dni), ale nie wykazał jego wpływu na poziom CK. Innych markerów uszkodzeń mięśni natomiast nie badano. Jak zauważają Ochi i Tsuchiya (2018) w pracy poświęconej przeglądowi badań nad wpływem PUFA na uszkodzenia mięśni wywołanych wysiłkiem konieczne może być opracowanie nowego markera o niewielkiej zmienności i przeprowadzenie weryfikacji przy jego użyciu.

5.4. Poziom markerów stanu zapalnego po wysiłku biegowym u biegaczy długodystansowych suplementowanych kompleksem lipidowym

Markery stanu zapalnego najczęściej poddawane są analizie wraz z markerami uszkodzeń mięśni: każde ćwiczenie narusza strukturę mięśni, w szczególności te z grupy tzw. EIMD (ang. *exercise-induced muscle damage*) do których należą m. in. ćwiczenia oporowe ekscentryczne, czy bieg w dół. Odpowiedź układu immunologicznego indukowana wysiłkiem fizycznym wiąże się ze zmianami hormonalnymi, metabolicznymi i fizjologicznymi (Pedersen i Hoffman-Goetz, 2000). Aktywność fizyczna o dużej intensywności prowadzi do uszkodzenia mięśni, co objawia się jest bólem i zwiększonym napięciem mięśni, zmniejszonym zakresem ruchów, a także zmęczeniem i utratą sił podczas wykonywanej pracy mięśniowej (Ament i Verkerke, 2009). Laboratoryjnym potwierdzeniem reakcji immunologicznej na stres wysiłkowy jest nasilenie leukocytozy (McCarthy i wsp. 1987; Rowbottom i Green, 2000) wraz ze zmianami w składzie odsetkowym krwinek białych. Za główną przyczynę powysiłkowej leukocytozy przyjmuje się wzrost objętości wyrzutowej serca oraz zmiany w interakcjach pomiędzy leukocytami, a śródbłonkiem naczyń (Avloniti i wsp. 2007).

Podczas gdy poziom leukocytów ma kluczowe znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania układu immunologicznego, decydującą rolę w zapoczątkowaniu i regulowaniu odpowiedzi immunologicznej odgrywają cytokiny. Powszechnie stosowanym w badaniach markerem stanu zapalnego wywołanego uszkodzeniem mięśni podczas wysiłku jest interleukina 6 (IL-6), glikoproteina o masie drobinowej 29kDa. IL-6 należy do grupy cytokin o charakterystycznym działaniu pro- i przeciwzapalnym (Fischer, 2006; Milewska i Grzelkowska-Kowalczyk, 2016; Suzuki, 2018). Wytwarzana jest między innymi przez monocyty, fibroblasty, komórki śródbłonna, limfocyty B i T oraz eozynofile (McCarthy i wsp. 1987; Rowbottom i Green, 2000). IL-6 odgrywa istotną rolę w zapoczątkowaniu reakcji ostrej fazy, wpływając na ekspresję genów kodujących syntezę większości białek tej fazy (Fischer, 2006; Fedawa i wsp. 2017).

Dowodzono, że kurczący się mięsień szkieletowy może syntezować i uwalniać interleukinę 6 do krwiobiegu w odpowiedzi na wysiłek fizyczny. Poznanych jest kilka mechanizmów, które wraz ze skurczem mięśni zwiększają syntezę tej cytokiny: upośledzona dostępność glukozy, zmiany w homeostazie wapnia, (Febbraio i wsp. 2003; Carey i wsp. 2006) i natężone powstawanie reaktywnych form tlenu (ROS) (Kosmidou i wsp. 2002, Fischer, 2006; Suzuki, 2018).

Liczne badania potwierdzają wydzielanie IL-6 w czasie wysiłku (Bruunsgaard i wsp. 1997; Ostrowski i wsp. 1999; Halson i wsp. 2003). Jednak czynniki wpływające na jej stężenie nie zostały dokładnie określone. Za podstawowe przyjmuje się intensywność i czas trwania ćwiczenia, ale poziom IL-6 w surowicy może zależeć również od nastawienia psychicznego do określonej aktywności. Według niektórych badaczy rodzaj wykonywanych ćwiczeń ma raczej niewielki wpływ (MacDonald i wsp. 2003; Fischer, 2006), podczas gdy Nieman i współautorzy (1998) wykazali, że wzrost stężenia IL-6 w surowicy krwi zależy od liczby włókien mięśniowych zaangażowanych w wysiłek fizyczny. Jeszcze inni autorzy uważają, że stężenie IL-6 w surowicy w ogóle nie jest zależne od uszkodzenia pracujących mięśni (Hirose i wsp. 2003).

Zwiększone wytwarzanie IL-6 jest jedną z głównych przyczyn odczuwania zmęczenia, bólu, zmian nastroju czy zaburzeń koncentracji (Vollmer-Conna i wsp. 2004), które są charakterystyczne po intensywnym wysiłku fizycznym, a ekstralnie długi wysiłek podczas biegu maratońskiego może spowodować nawet 100-krotny wzrost jej stężenia (Pedersen i wsp. 2003).

Inną oznaczaną cytokiną w badaniach prezentowanych w pracy był czynnik martwicy nowotworów (TNF- α). Należy on do grupy czynników indukujących wytwarzanie wielu białek,

a także przyczynia się do powstawania stanu zapalnego w organizmie. Jest centralnym mediatorem odpowiedzi zapalnej i jest wytwarzany przez większość aktywowanych leukocytów (*Tracey i Cerami, 1990*). TNF- α odgrywa kilka kluczowych ról w regulowaniu reakcji zapalnej, w tym w aktywacji i chemotaksji leukocytów, ekspresji cząsteczek adhezyjnych na neutrofilach i komórkach śródbłonna oraz regulacji wydzielania innych cytokin prozapalnych. TNF- α jest częścią złożonej sieci cytokin i jest zdolny do inicjowania kaskad cytokin obejmujących zarówno reakcje synergistyczne, jak i hamujące, które kontrolują syntezę i ekspresję innych cytokin, hormonów i ich receptorów (*Illei i Lipsky, 2000*).

W przeprowadzonych badaniach nie wykazano istotnego wpływu suplementacji na poziom TNF- α . Podobnie jak w badaniach Pumpy i wsp. (2011) w obu grupach zarówno przed jak i po suplementacji charakterystyczne było osiągnięcie największej wartości uzyskanej bezpośrednio wysiłku, a następnie stopniowe obniżanie się poziomu wskaźnika. Takiej zależności nie wykazał Mickleborough i wsp. (2015), który zaobserwował stopniowy wzrost TNF- α z osiągnięciem najwyższej wartości w 24 godzinie po wysiłku. W grupie SUPL zwracają uwagę obniżenie spoczynkowego poziomu cytokiny po trzech tygodniach przyjmowania kompleksu lipidowego, jednak nie była to zmiana istotna. Tymczasem w badaniach Buonocore i wsp. (2019) suplementacja kwasami omega-3 w ilości 4g/d przez osiem tygodni znacząco wpłynęła na obniżone spoczynkowe wartości TNF- α w grupie sportowców i osób prowadzący sedenteryjny tryb życia, z tym że u sportowców zmiana to była większa. Także w badaniach Bloomera i wsp. (2009) doszło do obniżenia spoczynkowego poziomu TNF- α w grupie suplementowanej, natomiast wysiłek fizyczny spowodował jego wzrost w obu grupach i jak zauważają autorzy na tym poziomie wytrenowania (regularna aktywność fizyczna) suplementacja nie ma wpływu na osłabienie zapalenia wywołanego wysiłkiem fizycznym. Do podobnych wniosków doszli Kyriakidou i wsp. (2021) gdzie u badanych wartości TNF- α zostały zmienione przez EIMD, ale nie różniły się między grupami. Z kolei Tartibian i wsp. (2011) i Mickleborough i wsp. (2015) wykazują istotne różnice międzygrupowe w obniżeniu poziomu markera zarówno w spoczynku jak i w 24-, 48- i 72-giej godzinie po wysiłku.

W przypadku IL-6 niezależnie od przyjmowanego suplementu maksymalne stężenie cytokiny zarejestrowano w pierwszej godzinie po wysiłku, a w 24 godzinie po wysiłku dochodziło do jego obniżenia. To co wydaje się być znamienne dla grupy SUPL po przyjmowaniu kompleksu lipidowego to osiąganie niższych (nieistotnie) niż przed suplementacją wartości wskaźnika po wysiłku, świadczące o hamowaniu procesu zapalnego. Podobne wyniki uzyskali Kyriakidou i wsp. (2021): po EIMD w grupie placebo doszło do

wzrostu IL-6, czego nie zaobserwowano w grupie przyjmującej kwasy omega-3; podobnie jak w niniejszych badaniach różnice między grupami nie były jednak istotne. Znamienny wpływ działania kwasów omega-3 na zahamowanie procesu zapalnego w powysiłkowej fazie ostrej, determinowany obniżeniem poziomu IL-6 wykazali DiLorenzo i wsp. (2014), Philips i wsp. (2003), Tsuchiya i wsp. (2016) i Houghton i Onambele (2012) aplikując badanym typowe ćwiczenia indukujące uszkodzenia mięśniowe (oporowe ekscentryczne), a także Tartibian i wsp. (2011) oraz Mickleborough i wsp. (2015) stosując protokół wysiłku wytrzymałościowego z komponentą pracy ekscentrycznej; dawka suplementu wahała się od 0,36g do 2g EPA/DHA. Z drugiej strony Lenn i wsp. (2002) stosując dawkę 1,8 g/dzień przez 30 dni nie wykazali związku między suplementacją a obniżeniem wskaźników stanu zapalnego (IL-6 i TNF- α).

Należy zauważyć, że wszystkie te badania dotyczą osób nietreningujących. Niewiele jest natomiast wyników badań na sportowcach, u których reakcja na podejmowany wysiłek w postaci uszkodzeń mięśniowych i narastającego stanu zapalnego może się różnić od tej występującej u osób nie uprawiających sportu regularnie. Zmniejszone odpowiedzi zapalne w postaci obniżenia poziomu TNF- α po intensywnym wysiłku odnotowano w grupie sportowców - wioślarzy, którzy otrzymali dawki 1,2 g EPA i 2,4 g DHA (*Delfan i wsp. 2015*). U piłkarzy częściowo korzystne wyniki odnotowano po podaniu 1,16 g DHA przez 8 tygodni, wywierając działanie przeciwzapalne poprzez zwiększanie PGE2 w osoczu (*Capó i wsp. 2016*). Brak jest w literaturze natomiast odniesień do zawodników biegających ultramaratony.

5.5. Ocena stopnia regeneracji w spoczynku i po wysiłku biegowym u biegaczy długodystansowych suplementowanych kompleksem lipidowym

To w jakim tempie przebiega regeneracja powysiłkowa ma bardzo duże znaczenie w ciągłości procesu treningowego: zbyt długo utrzymujące się efekty treningu uniemożliwiają efektywne wejście w kolejny trening. Dlatego dietetycy sportowi i trenerzy z tak dużym zainteresowaniem śledzą doniesienia o skuteczności niektórych suplementów na ograniczenie objawów powysiłkowych i przyspieszenie regeneracji. Do objawów tych należą najczęściej bolesność mięśniowa, sztywność i napięcie mięśniowe, a także obrzęk, zaczerwienienie czy miejscowy wzrost temperatury, a do ich oceny wykorzystuje się między innymi badanie zakresu ruchu (ROM), momentu obrotowego w stawie (ang. *torque*) lub maksymalnego skurczu dowolnego (ang. *maximal voluntary contraction, MVC*), a także analogowe skale

bólu (VAS, ang. *visual analog scale*) W niniejszej pracy badanymi wskaźnikami stopnia regeneracji były bolesność mięśniowa oceniana przy pomocy progów bólu i napięcie mięśniowe analizowane na podstawie obszaru pod krzywą.

Odczuwanie bólu jest zjawiskiem fizjologicznym i ma miejsce na skutek drażnienia bodźcem mechanicznym, bądź chemicznym (np: bradykinina, histamina, ATP, serotonina, jony wodorowe i potasowe) nocycyptywnych zakończeń nerwowych mięśni szkieletowych, obniżając próg bólu. Interesujące w przypadku nocycceptorów jest zjawisko sensytyzacji - zazwyczaj receptor poddany powtarzalnemu, przewlekłemu drażnieniu staje się coraz mniej wrażliwy na kolejne bodźce. Zjawisko to nie dotyczy jednak nocycceptorów. a w związku z powtarzalnym drażnieniem zakończeń nocycyptywnych może dochodzić do uwrażliwienia receptorów. Ból mięśniowy określany także jako „mialgia” stanowi około 10% wszystkich rodzajów bólów (Nicpoń 2007). Może być skutkiem bardzo wielu jednostek chorobowych i dysfunkcji drażniących receptory bólowe i może pochodzić ze struktur anatomicznych odległych od danego mięśnia. Pod względem topograficznym analiza powysiłkowego bólu mięśniowego nie stanowi jednak problemu i zazwyczaj ogranicza się do najbardziej obciążonych grup mięśniowych w danej aktywności ruchowej.

Podstawową przyczyną bólu mięśniowego pojawiającego się bezpośrednio po wysiłku fizycznym jest drażnienie zakończeń nerwowych przez gromadzący się mleczan i jony wodorowe oraz powstające mikroobrzęki. To z kolei, upośledza przepływ krwi przez mięsień wyzwalając reakcję niedokrwienną z jednej strony, z drugiej natomiast, zaburzenie odprowadzenia metabolitów kwaśnych, amoniaku, fosforanu nieorganicznego wyzwalając następnie „kryzys energetyczny mięśni”.

Ważną funkcję pomocniczą w rozpoznawaniu bólów mięśniowych stanowią badania morfologiczne krwi. Wśród innych metod diagnostycznych bólu mięśniowego należy również wymienić badania elektromiograficzne, tomografię komputerową, magnetyczny rezonans, badania ultrasonograficzne (Zivkovic i wsp. 2002), a także nieinwazyjne subiektywne kwestionariusze i skale odczuwania bólu (np. ang. *visual analog scale* - VAS).

Oddzielnym zjawiskiem związanym z wysiłkowym bólem mięśniowym jest zespół opóźnionego bólu mięśniowego (DOMS). Aktualnie teoria ta głównie odnosi się do charakterystycznych mikroskopijnych uszkodzeń linii Z w sarkomerach, których nie zaobserwowano w przypadku zwykłego bólu mięśniowego (Brown i wsp. 1999, Stupka i wsp. 2000, Jaskolska i wsp. 2002, Cheung i wsp. 2003,). Jednak to, że za wystąpieniem DOMS odpowiadają także inne mechanizmy (m.in. proces zapalny czy zaburzony dokomórkowy transport jonów wapnia), znajduje potwierdzenie w rozbieżności czasowej pomiędzy

pojawieniem się bólu, a szczytem wystąpienia mikroskopijnych uszkodzeń. Obszerne badania dotyczące czasu występowania DOMS przeprowadzili Hortobagyi i wsp. (1998). Zaobserwowali oni, że opisane zmiany uszkodzeń utrzymywały się do 7 dni po wysiłku. Interesujący jest fakt, że po 2 tygodniach, kiedy powtórzono testy ekscentrycznego wysiłku, mikroskopijna analiza pokrywa się z obrazem z badania pierwszego, ale w tym przypadku, siła mięśniowa nie obniżała się tak znacząco jak w pierwszych próbach, co autorzy tłumaczyli mechanizmami adaptacyjnymi jednostek nie biorących udziału w skurczu ekscentrycznym. Z badań wynikało także, że procesy rekonstrukcyjne po intensywnych wysiłkach zakończyły się po 3 - 4 tygodniach, a więc uszkodzona tkanka inicjowała cały system naprawczy identyczny jak w przypadku klasycznego uszkodzenia tkanki z reakcją hemostazy, zapalną, proliferacji, przebudowy i formowania.

Obserwacje występowania zaburzonej architektury miofibrili, a więc wielkości uszkodzeń tkanki mięśniowej, badacze prowadzili w różnych okresach, generalnie opierając się na obserwacji, że bolesność objawiająca się sztywnością i / lub tkliwością mięśni zwiększa się w ciągu pierwszych 24 godzin po wysiłku i osiąga szczyt między 24 a 48 godziną (rzadziej między 48, a 72), a następnie ustępuje i ostatecznie zanika w ciągu 5–7 dni (Hume i wsp. 2004, Lv ZT i wsp. 2020).

W przeprowadzonych badaniach ból mięśniowy, jako niekorzystne zjawisko powysiłkowe został oceniony przy pomocy algometry. Stopień odczuwania bólu w kolejnych pomiarach wykorzystano do oceny regeneracji powysiłkowej biegaczy. Analizując dane należy pamiętać, że uzyskanie wysokich wartości świadczy o dobrej tolerancji na ból. Tym samym zwiększenie PT między pomiarami bądź badaniami jest zjawiskiem pozytywnym: oznacza, że zaaplikowanie większego niż wyjściowo ucisku powoduje ból. Zgodnie z tym co zostało już powiedziane większość badaczy potwierdza, że największa bolesność mięśniowa związana z DOMS występuje między 24, a 48 godziną. W niniejszych badaniach ostatni pomiar był wykonywany w 24 godzinie, można jednak prognozować późniejsze odczucia bólowe na podstawie wcześniejszych pomiarów. Ogólna tendencja uzyskiwanych wyników była następująca: w badaniu 1 najniższy wynik, równoznaczny z największą bolesnością mięśniową osiąganą w 24 godzinie po wysiłku. Natomiast w badaniu 2, niezależnie od podawanego suplementu najniższym wynikiem charakteryzował się pomiar bezpośrednio po wysiłku, a następnie w pierwszej godzinie po wysiłku dochodziło do zwiększenia tolerancji bólowej, a różnice między grupami pojawiały się dopiero w 24 godzinie po wysiłku. W przypadku mięśnia czworogłowego suplementacja kompleksem lipidowym powodowała dalszą poprawę tolerancji bólowej. Odnosząc wartości PT z 24 godziny do wartości spoczynkowych w grupie

SUPL w obu kończynach doszło nawet do przekroczenia poziomu z pomiaru spoczynkowego (istotnie w lewej kończynie, $p < 0,05$). Taki wynik pozwala przypuszczać, że narastanie bólu związanego z DOMS zostało zahamowane w grupie przyjmującej kompleks lipidowy, czego nie można powiedzieć o grupie PL, gdzie po wzroście w pierwszej godzinie po wysiłku, w 24 godzinie dochodziło znowu do obniżenia wartości PT (spadek tolerancji bólowej).

Wyraźnych różnic nie zarejestrowano w przypadku mięśnia dwugłowego. Analizując różnice między badaniami w obu kończynach większe zmiany zarejestrowano w grupie SUPL, a widoczny na rycinach możliwy wpływ suplementacji kompleksem lipidowym dotyczy pomiaru z 24 godziny po wysiłku. Niezależnie od przyjmowanego suplementu dla obu kończyn w badaniu 1 pomiar PT w 24 godzinie charakteryzował się spadkiem wartości PT (pogorszeniem tolerancji bólowej) w stosunku do pomiaru poprzedniego. W obu grupach uzyskana wartość była również istotnie niższa od spoczynkowej. W badaniu 2 natomiast wartości PT utrzymywały się na zbliżonym poziomie do pomiaru z pierwszej godziny po wysiłku. Dla obu kończyn charakterystyczne było więc to, że niezależnie od przyjmowanego suplementu, PT w 24 godzinie nie wykazywał takiego spadku, jaki miał miejsce w badaniu przed suplementacją.

Drugim wskaźnikiem stopnia regeneracji badanym w niniejszej pracy było napięcie mięśniowe. Z definicji napięcie mięśniowe to stan przedłużonego skurczu mięśni szkieletowych (tonus) określający elastyczność strukturalną i pasywność oporową występującą w czasie biernego rozciągania. Nawet najbardziej rozluźniony mięsień, jeżeli jest zdrowy wykazuje pewien tonus spoczynkowy i jest on zależny od mechanicznych parametrów tkanki, takich jak lepkość czy sprężystość. Szczególne znaczenie mają właściwości struktury biernej mięśnia jaką jest tkanka łączna nadająca mięśniom odpowiedni kształt i zwartość (Błaszczyk, 2004).

Regulacja napięcia mięśniowego kontrolowana jest w ośrodkach rdzeniowych zapewniających odpowiednią długość mięśnia, częstotliwość wyładowań eferentnych i ilość zaangażowanych w pracę jednostek motorycznych oraz w korze mózgowej, scalającej informacje płynące z obwodu (proprioceptory), decydującej o płynności, równowadze i jakości koordynacji ruchu. Zaburzenia elektrolitowe, wzrost temperatury, gromadzenie się metabolitów czy mikrozmiiany strukturalne włókien mięśniowych podczas wysiłku prowadzą do impulsacji centralnego układu nerwowego, który odpowiadając za regulację napięcia powoduje jego wzrost w pracującym mięśniu.

W badaniach własnych do analizy napięcia mięśniowego wykorzystano miotonometr. Analizowano obszar pod krzywą (AUC), który jak już wcześniej wspomniano jest umowną

jednostką będącą wypadkową wartością krzywej odkształcenia tkanek, siły zaaplikowanej przez miotonometr oraz wielkości przemieszczenia tkanki. Badania Leonarda i wsp. (2003), Coral-Gubler i wsp. (2007), Hersh-Shaina (2009) i innych wykazały brak istotnych statystycznie różnic pomiędzy wynikami metody miotonometrycznej w porównaniu z analizą powierzchniową elektromiografii. Znaczna korelacja z zapisem EMG i bezinwazyjność metody spowodowały, że badanie miotonometryczne jest z powodzeniem stosowane do oceny napięcia mięśni i tkanki podskórnej.

W przypadku badania miotometrem należy pamiętać, że im mniej odkształcona tkanka (AUC) tym bardziej napięty mięsień. Tym samym, zjawiskiem pozytywnym jest zwiększenie AUC oznaczające obniżenie napięcia mięśniowego. Wpływ trzytygodniowej suplementacji wykazano zarówno w grupie PL jak i SUPL. W grupie przyjmującej kompleks lipidowy wiązał się on z oczekiwanym wzrostem AUC, a zmiany dotyczyły przede wszystkim obniżenia napięcia mięśniowego w spoczynku i bezpośrednio po wysiłku. Niezależnie od grupy charakterystyczne dla tego wskaźnika było osiągnięcie najniższej wartości właśnie bezpośrednio po wysiłku, zarówno przed jak i po suplementacji. W grupie SUPL dochodziło następnie do delikatnego wzrostu (obniżenia napięcia) w pierwszej godzinie po wysiłku, a następnie, w 24 godzinie do ponownego obniżenia AUC równoznacznego z narastaniem napięcia mięśniowego. Ten ostatni pomiar we wszystkich przypadkach (kończyna lewa / prawa, mięsień czworogłowy / dwugłowy) przed suplementacją charakteryzował się istotnym spadkiem w stosunku do wartości spoczynkowych, natomiast po suplementacji różnice, również we wszystkich przypadkach nie były aż tak znamienne. Mogłoby to oznaczać, że w skutek przyjmowania kompleksu lipidowego nie dochodziło do tak dużego narastania napięcia mięśniowego w 24 godzinie po wysiłku.

Pewna trudność w interpretacji wyników dotyczy grupy PL, gdzie w badaniu 1, wyjściowo we wszystkich pomiarach uzyskano istotnie wyższe wartości AUC niż w grupie SUPL. Zastanawiające jest również dlaczego po okresie suplementacji doszło do obniżenia wskaźnika (wzrost napięcia mięśniowego) również we wszystkich pomiarach, a także czemu w grupie tej przed suplementacją w 24 godzinie dochodziło do obniżania napięcia mięśniowego w porównaniu do wcześniejszych pomiarów powysiłkowych.

Wpływ nutraceutyków w tym suplementacji kwasami EPA/DHA na zmniejszenie opóźnionej bolesności mięśniowej budzi niezmiennie zainteresowanie badaczy sportowych. Jednak większość badań przeprowadzonych na sportowcach ocenia ich wpływ na DOMS analizując wskaźniki, które zostały już opisane w niniejszej pracy: markery uszkodzenia mięśni, markery stanu zapalnego, a także wskaźniki stresu oksydacyjnego i uszkodzenia błon

komórkowych. W ten sposób wpływ suplementacji kwasami omega oceniano w cytowanych wcześniej badaniach u wioślarzy (*Delfan i wsp. 2015*), piłkarzy (*Martorell i wsp. 2014*), czy sportowców uprawiających sztuk walki (*Filaire i wsp. 2010, Capo i wsp. 2016(b)*). Badania na piłkarzach z analizą odczuwanego napięcia powysiłkowego przeprowadził Philpott i wsp. (*2018*) porównując skuteczność różnych suplementów. Bolesność mięśniowa, wyrażona jako pole pod krzywą (AUC) podczas 72-godzinnej regeneracji, była mniejsza w grupie suplementowanej rybim olejem (0,55 g DHA i 0,55 g EPA) niż w grupie przyjmującej inne suplementy. Nie zaobserwowano natomiast różnic w wynikach gry w piłkę nożną między grupami. Z kolei Gray i wsp. (*2014*) wykazali brak różnic między grupami suplementowaną i placebo w bolesności mięśniowej i maksymalnym skurczu dowolnym, przy jednoczesnym obniżeniu wskaźników stresu oksydacyjnego (H_2O_2 , kwas tiobarbiturowy w osoczu) w grupie przyjmującej 1,3 g EPA i 0,3 g DHA. Badanie dotyczyło osób uprawiających sport na poziomie rekreacyjnym. Najważniejszym odniesieniem biorąc pod uwagę protokół badań, a także sposób oceny DOMS wydaje się być cytowana wielokrotnie praca Pumpy i wsp. (*2011*), który oprócz VAS wykorzystał algzymetr. Wyniki VAS nie wykazały istotnych różnic między grupami: w obydwu grupach istotny wzrost bólu względem wartości spoczynkowych wskazano w 24 godzinie, a następnie dochodziło do jego stopniowego obniżania. Mniejsze wartości w 48 i przede wszystkim w 72 godzinie wskazano w grupie suplementowanej, ale nie były to różnice istotne. Badanie algzymetrem również nie wykazało wyraźnych różnic między grupami z tą różnicą, że obniżenie PT w 24 godzinie nie było istotne. Dla przypomnienia w niniejszej pracy w 24 godzinie po wysiłku w grupie suplementowanej nie dochodziło już do dalszego obniżania PT jakie miało miejsce w poprzednich pomiarach.

Tymczasem do oceny DOMS u amatorów bardzo często wykorzystywano w badaniach inne narzędzia: głównie VAS połączone z badaniem MVC, ROM i obrzękiem/obwodem kończyny. Najczęściej do wywołania największego efektu EIMD stosowano protokół ekscentrycznego zgięcia łokcia. Na tej podstawie Lembke i wsp. (*2014*), że spożycie 2,7 g kwasów tłuszczowych omega-3 przez 30 dni może zmniejszyć DOMS po ekscentrycznych skurczach w porównaniu do spożycia oleju słonecznikowego. Również spożycie wysokiej dawki 3 g kwasu tłuszczowego omega-3 przez zaledwie 7 dni, również spowodowało istotne zmniejszenie się DOMS po wysiłku ekscentrycznym (*Jouris i wsp. 2011*). Do podobnych wniosków doszli Corder i wsp. (*2016*), Tinsley i wsp. (*2016*) i Thishua i wsp. (*2016*), a podstawowym narzędziem do oceny DOMS była VAS. Tymczasem DiLorenzo i wsp. (*2014*) stosując dawkę 2 g DHA przez 4 tygodnie nie wykazał różnic w przebiegu DOMS na podstawie analizy AUC, ROM i maksymalnego skurczu izometrycznego i izokinetycznego. Różnic nie

zaobserwowali również Houghton i Onambele (2012) i Gray i wsp. (2014), stosując protokoły badań angażujące inne grupy mięśniowe, a podawane dawki wynosiły 0,36 g EPA przez 3 tygodnie i 1,6 g EPA/DHA przez 6 tygodni. W obydwóch badaniach wykorzystano ocenę maksymalnego skurczu, a narzędziami pomocniczymi były skale subiektywne bólu lub odczucia wysiłku. Kyriakidou i wsp. (2021), stosując podobny protokół do opisywanego w niniejszych badaniach wykazał istotne różnice w 24 godzinie po wysiłku w postrzeganiu bólu (VAS) i nieistotne zmiany maksymalnego izometrycznego skurczu, suplementując badanych 3 g kwasami omega 3 przez 4 tygodnie. Z kolei badanie, w którym przyjmowano 1,8 g kwasów tłuszczowych omega-3, wykazało zmniejszenie DOMS na podstawie skali bólu, ROM, ale dopiero w 48 godzinie po ćwiczeniach (brak różnic bezpośrednio i 24 godziny po wysiłku (Tartibian i wsp. 2009). Dawkę i protokół identyczne do tych opisywanych w niniejszych badaniach zastosował Mickleborough i wsp. (2015), który zaobserwował znacznie mniejszą utratę siły (MVC) i ROM stawów w 96 godzinie po protokole biegowym. Z kolei w 24 godzinie po wysiłku odczuwany ból był istotnie większy w porównaniu do wartości wyjściowej tylko w grupie placebo. Co ważne w badaniach do jego oceny oprócz skali analogowej wykorzystano próg bólu związanego z uciskiem, który mierzono w pięciu określonych miejscach mięśnia czworogłowego za pomocą cyfrowego algometru w celu ilościowego określenia tkliwości mięśni.

Podsumowując rolę EPA/DHA w regeneracji powysiłkowej należy podkreślić, że większość dowodów pochodzi z badań przeprowadzonych na amatorach, a nie na sportowcach. Korzystając z analizy przeprowadzonej przez Thielecke i Blannin (2021), którzy porównywali wpływ kwasów omega-3 na poprawę wydolności, poziom markerów funkcjonalnej odpowiedzi na wysiłek fizyczny i przebieg regeneracji w tych dwóch grupach na podstawie dostępnych publikacji można stwierdzić, że wyniki są bardziej przejrzyste dla amatorów. W przypadku danych dotyczących regeneracji zebrane dowody przemawiają za wyższymi dawkami i dłuższym okresem suplementacji u sportowców: badania trwające krócej niż 8 tygodni u sportowców nie wykazały wyraźnych korzyści płynących z przyjmowania kwasów tłuszczowych omega-3, skuteczna dawka wynosiła najczęściej powyżej 1,14 g / dzień. Autorzy przeglądu sugerują, że suplementując EPA / DHA amatorzy odnoszą większe korzyści, szczególnie w postaci zmniejszenia bolesności mięśniowej. Jednakże porównywali oni wyniki badań we wszystkich dostępnych publikacjach, biorąc pod uwagę różne składowe stopnia regeneracji, co więcej, mierzone różnorodnymi narzędziami. Badanie powysiłkowego napięcia mięśniowego czy maksymalnego skurczu dowolnego wydaje się być najbardziej obiektywną metodą oceny stopnia regeneracji. Pokazuje ona możliwości funkcjonalne mięśnia,

jego gotowości do ponownego podjęcia wysiłku. W analizowaniu DOMS nie można jednak zapomnieć o komponentcie bólowej, a ta u sportowców była brana pod uwagę zaledwie w trzech cytowanych w pracy badaniach. Najczęstszym narzędziem oceny bólu pozostają analogowe skale wizualne, gdzie badany subiektywnie zaznacza odczucie bolesności w skali od 0 (minimalny) do 10 (maksymalny) w określonej pozycji w stawie przy izometrycznie napiętym mięśniu. Ze względu na duży subiektywizm metody w niniejszej pracy zastosowano algometr. To co zwróciło uwagę, to generalnie wyższe wyniki wskazujące na zwiększenie tolerancji bólowej na aplikowany ucisk głowicy w drugim badaniu we wszystkich pomiarach w obu grupach. Mogłoby to wskazywać na jakiś efekt dodatkowy badania tym narzędziem, który należałoby poddać analizie w odrębnych badaniach.

Analizując wpływ suplementacji zastosowanym w niniejszych badaniach kompleksem lipidowym porównywano go do grupy kontrolnej, która przyjmowała kapsułki placebo z oliwy z oliwek. Porównując różnice w składzie kapsułek aktywnych i kapsułek placebo, prawdopodobni „kandydaci” na składniki aktywne kompleksu lipidowego to kwasy tłuszczowe omega-3, kwas eikozapentaenowy (EPA) i kwas dokozaheksaenowy (DHA). Dlatego też odnoszono się do publikacji, w których podawano mieszanki kwasów EPA i DHA w różnych proporcjach i dawkach. Należy jednak pamiętać, że kompleks lipidowy Lyprinol[®], oprócz dwóch podstawowych kwasów omega-3, zawiera kwas oktadecatetraenowy, kwas eikozapentaenowy, estry sterolu, polarne lipidy i karotenoidy. Przeprowadzając badania z wykorzystaniem tego suplementu wykazano, że ma działanie przeciwzapalne przez ograniczanie szlaków lipoksygenazy i cykloksygenazy-2, które są odpowiedzialne za produkcję prozapalnych leukotrienów, niektórych prostaglandyn i eikozanoidów (Halpern, 2000). Hamujący wpływ Lyprinolu[®] wynika z jego unikalnego składu. Unikalny na tyle, że Kim i Lee (2014) w przeglądzie poświęconym suplementom stosowanym dla ograniczenia DOMS zakwalifikowali go jako odrębny środek niż grupa kwasów omega-3. W związku z powyższym wyniki niniejszej pracy mogłyby być rozpatrywane wraz z zaledwie czterema innymi badaniami, z których każde dostarcza innych informacji dotyczących skuteczności PCSO-524[®] w zmniejszaniu DOMS i wskaźników wpływających na jego przebieg.

Wpływ kompleksu lipidowego na stan zapalny i uszkodzenia mięśni wywołane wysiłkiem fizycznym analizowano w badaniach Pumpy i wsp. (2011), Bauma i wsp. (2013), Mickleborougha i wsp. (2015) i Barenie i wsp. (2020) Porównując szczegółowo badania, u Mickleborougha i wsp. (2015) dla wywołania efektu DOMS u amatorów zastosowano protokół biegu w dół o nachyleniu 16% z obciążeniem 70% VO₂ max przez 20 min, a przyjmowana dawka suplementu to 400 mg/d kompleksu lipidowego PCSO-524[®] (1200 mg

suplementu) przez 30 dni. W badaniu uzyskano istotne różnice między grupami praktycznie we wszystkich wskaźnikach (CK, Mb, TNF, DOMS). U Pumpy i wsp. (2011) natomiast, który badał sportowców różnych dyscyplin sportowych (piłkarze, kolarze, biegacze średnio i długodystansowi) protokół obejmował 5 biegów po 8 minut z obciążeniem 80% maksymalnego tętna i gradientem -10% oraz 2 minuty chodu po płaskiej powierzchni między kolejnymi biegami, a suplementowana dawka wynosiła 200 mg/d PCSO-524[®] (600 mg suplementu) przez 8 tygodni, a więc sumarycznie dawka w obu badaniach była taka sama. Autorzy badań nie odnotowali statystycznie istotnego wpływu na DOMS, CK krwi, Mb lub poziomy cytokin. Jednak interesujące jest obserwowanie graficznie przedstawionych różnic między grupą aktywną i grupą placebo. Średnie aktywności CK, stężenia IL-6 i Mb (w okresie po 24 godzinach po wysiłku) i DOMS (w okresie 48-96 godzin), były niższe w grupie przyjmującej suplement.

Protokół biegu w dół i dwa razy mniejszą dawkę (600 mg/d suplementu przez 30 dni) wykorzystali w swoich badaniach Barenie i wsp. (2020), którzy porównywali efekt działania ESPO-572[®] (ang. *krill oil*) i PCSO-524[®]. W grupie stosującej kompleks lipidowy wykazali oni zmniejszanie wzrostu DOMS po 24, 48, 72 godzinach po wysiłku na podstawie wizualnej skali analogowej i brak istotnych różnic w badaniu PT, a badanymi były osoby nietreningujące. Jeszcze inne badania zaproponował Baum i wsp. (2013), którzy testowali wpływ suplementu u biegaczy długodystansowych na DOMS po 30 km biegu w płaskim terenie z prędkością korespondującą z tą zmierzoną z 70% VO_{2max} . Po suplementacji dawką 400 mg/d kompleksu lipidowego PCSO-524[®] przez 11 tygodni zaobserwowano zmniejszone wrażenia bólowe (VAS), a efekt ten był większy u biegaczy o niższym poziomie wytrenowania.

Ostatnie zagadnienie na które warto zwrócić uwagę to zalecana przez producenta dawka Lyprinolu[®], a dawki mieszanek kwasów omega-3, które są brane pod uwagę w suplementacji. W przyjmowanych 1200 mg/d suplementu 400 mg to substancja aktywna - kompleks lipidowy, natomiast resztę stanowi oliwa z oliwek. W tych 400 mg zawarte jest około 58mg EPA i 44 mg DHA i 1,8 mg witaminy E, zatem EPA/DHA podawane było w dawce blisko 0,1 g. Jest to dużo mniejsza dawka niż ta uznawana za efektywną - 1,14 g/d (Thielecke i Blannin, 2021). Skuteczność działania suplementu musi więc wynikać z wszystkich składników tworzących suplement, nawet w większym stopniu niż z samych kwasów Omega-3. Dawka 0,1 g/d EPA/DHA jest też o wiele niższa niż te oscylujące wokół wartości 500 mg/d, które są sugerowane przez różne organizacje prozdrowotne (Kris-Etherton i wsp. 2009). Skoro bezpiecznie można przyjmować prawie pięciokrotnie większą dawkę kwasów omega-3, być może zasadne byłoby zwiększenie ilości podawanego suplementu, ale badania dotyczące

bezpieczeństwa stosowania większej dawki pozostają w kwestii producenta. Zalecenia Polskiego Komitetu Olimpijskiego dla lekkoatletów mówią natomiast o nie przekraczaniu dawki 1200 mg dziennie.

6. WNIOSKI

Na podstawie uzyskanych wyników badań sformułowano następujące wnioski:

1. Trzytygodniowe przyjmowanie kompleksu lipidowego w ilości 1200 mg dziennie nie obniżyło poziomu kwasów tłuszczowych nasyconych i tłuszczów TRANS w krwinkach czerwonych badanych biegaczy. Suplementacja wywołała korzystne zmiany stosunku AA/EPA. Obserwowane większe obniżenie wskaźnika w grupie suplementowanej może wynikać zarówno z zawartości świadczy kwasu eikozapentaenowego w przyjmowanym kompleksie jak i z jego hamującego wpływu na metabolizm kwasu arachidonowego.
2. Suplementacja kompleksem lipidowym nie wpłynęła znacząco na równowagę prooksydacyjno-antyoksydacyjną, poziom markerów uszkodzenia mięśni i mediatorów stanu zapalnego u badanych biegaczy. Wśród badanych enzymów antyoksydacyjnych najkorzystniejsze zmiany obserwowano jedynie w aktywności dysmutazy ponadtlenkowej bezpośrednio po i w pierwszej godzinie po wysiłku.
3. Zaobserwowano korzystny wpływ suplementu na poziom odczuwanego bólu i napięcia mięśniowego przy użyciu zastosowanych narzędzi pomiarowych. W przypadku bólu mięśniowego charakterystyczne dla grupy przyjmującej kompleks lipidowy są rosnące, w stosunku do wcześniejszych pomiarów, wartości progu bólu w 24 godzinie. Dodatkowo znaczne obniżenie napięcia mięśniowego w pomiarach spoczynkowych i bezpośrednio po wysiłku, a także stosunkowo wysokie poziomy AUC w ostatnim pomiarze, wskazujące na niższe napięcie mięśniowe, mogą świadczyć o korzystnym wpływie suplementu na przebieg procesu regeneracji.
4. W celu zbadania dokładniejszego wpływu kompleksu lipidowego na przebieg regeneracji mięśniowej, a przede wszystkim wystąpienie opóźnionej bolesności mięśniowej konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań rozszerzonych o pomiary w 48 i 72 godzinie.

Piśmiennictwo

1. Abreu IA, Cabelli DE. Superoxide dismutases - a review of the metal-associated mechanistic variations. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1804(2): 263-274.
2. Alpert JS, Thygesen K, Antman E, Bassand JP. Myocardial infarction redefined--a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2000; 36(3): 959-69.
3. Ament W, Verkerke GJ. Exercise and fatigue. *Sports Med.* 2009; 39(5): 389-422.
4. Anderson A, Nielsen C, Tengblad S, Vesby B. Fatty acid composition of skeletal muscle reflects dietary fat composition in humans. *Am J Clin Nutr.* 2002; 76: 1222-1229.
5. Avloniti A.A., Douda H.T., Tokmakidis S.P., Kortsaris A.H., Papadopoulou E.G., Spanoudakis E.G. Acute effects of soccer training on white blood cell count in elite female players. *Int J Sports Physiol Perform.* 2007; 2(3): 239-249.
6. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev.* 2014; 360438: 1-31.
7. Azizbeigi K, Stannard SR, Atashak S, Mosalman-Haghighi M. Antioxidant enzymes and oxidative stress adaptation to exercise training: comparison of endurance, resistance, and concurrent training in untrained males. *J Exerc Sci Fitness* 2014; 12: 1-6.
8. Barenie Ms Rd MJ, Freemans Ms JA, Baranauskas PhD MN, Goss Msk CS, Freeman Ms KL, Chen Ms X, Dickinson Ms SL, Fly PhD Cfs AD, Kawata PhD K, Chapman PhD Facsm RF, Mickleborough PhD TD. Effectiveness of a combined New Zealand green-lipped mussel and Antarctic krill oil supplement on markers of exercise-induced muscle damage and inflammation in untrained men. *J Diet Suppl.* 2020; 9: 1-26.
9. Baum K, Telford RD, Cunningham RB. Marine oil dietary supplementation reduces delayed onset muscle soreness after a 30 km run. *Open Access J Sports Med.* 2013; 6(4): 109-15.
10. Bassett DRJr, Howley ET. Limiting factors for maximum oxygen uptake and determinants of endurance performance. *Med. Sci. Sports Exerc.* 2000; 32(1): 70- 84.
11. Bednarek J, Kępińska M, Augustyn G, Szyguła Z. Zmęczenie i przetrenowanie – zarys problemu. *Medicina Sportiva Practica* 2013; 13(3): 83-88.
12. Benedetti S, Catalani S, Peda F, Luchetti F, Citarella R, Battistelli S. Impact of the 24- h ultramarathon race on homocysteine, oxidized low-density lipoprotein, and paraoxonase 1 levels in professional runners. *PLoS One.* 2018; 13(2): e0192392.

13. Billat VL, Demarle A, Slawinski J, Paiva M, Koralsztein JP. Physical and training characteristics of top-class marathon runners. *Med Sci Sports Exerc.* 2001; 33(12): 2089-2097.
14. Bilaska A, Kryczyk A, Włodek L. Różne oblicza biologicznej roli glutationu. *Postepy Hig Med Dośw.* (online) 2007; 61: 438-453.
15. Bloomer RJ, Larson DE, Fisher-Wellman KH, Galpin AJ, Schilling BK. Effects of eicosapenaenoic acid and docosahexaenoic acid on resting and exercise-induced inflammatory and oxidative stress biomarkers: a randomized, placebo controlled, cross-over study. *Lipids Health Dis.* 2009; 8: 36.
16. Bloomstrand E, Eliasson J, Karlsson HR, Kohnke R. Branched-chain amino acids activate key enzymes in protein synthesis after physical exercise. *JN* 2006; 136(1): 269-273.
17. Błaszczak JW. *Biomechanika kliniczna*. PZWL, Warszawa 2004.
18. Booth F, Tseng B, Fluck M, Carson JA. Molecular and cellular adaptation of muscle in response to physical training. *Acta Physiol Scand.* 1998; 162: 343-350.
19. Boss A, Lecoultre V, Ruffieux C, Tappy L, Schneiter P. Combined effects of endurance training and dietary unsaturated fatty acids on physical performance, fat oxidation and insulin sensitivity. *Br J Nutr.* 2010; 103: 1151-79.
20. Brich K, MacLaren D, George K. *Fizjologia sportu*, PWN, Warszawa 2012.
21. Brolinson PG, Elliott D. Exercise and the immune system. *Clin Sports Med.* 2007; 26(3): 311-319.
22. Brown S, Day S, Donnelly A. Indirect evidence of human skeletal muscle damage and collagen breakdown after eccentric muscle actions. *Eur J Sport Sci.* 1999; 17: 82-97.
23. Bruunsgaard H, Galbo H, Halkjaer-Kristensen J, Johansen TL, MacLean DA, Pedersen BK. Exercise-induced increase in serum interleukin-6 in humans is related to muscle damage. *J Physiol (Lond)* 1997; 499(3): 833-841.
24. Buonocore D, Verri M, Giolitto A. Effect of 8-week n-3 fatty-acid supplementation on oxidative stress and inflammation in middle- and long-distance running athletes: a pilot study. *J Int Soc Sports Nutr.* 2020; 17: 55.
25. Callegari GA, Novaes JS, Neto GR, Dias I, Garrido ND, Dani C. Creatine Kinase and Lactate Dehydrogenase Responses after Different Resistance and Aerobic Exercise Protocols. *J Hum Kinet.* 2017; 58: 65-72.

26. Całyniuk B, Grochowska-Nidworok E, Walkiewicz KW, Kawecka S, Popiołek E, Fatyga E. Malondialdehyde (MDA)-product of lipid peroxidation as marker of homeostasis disorders and aging. *Ann Acad Med Siles.* 2016; 70: 224-228.
27. Capó X, Martorell M, Sureda A. Diet supplementation with DHA-enriched food in football players during training season enhances the mitochondrial antioxidant capabilities in blood mononuclear cells. *Eur J Nutr.* 2015; 54(1): 35-49.
28. Capó X, Martorell M, Sureda A. (a) Effects of dietary Docosahexaenoic, training and acute exercise on lipid mediators. *J Int Soc Sports Nutr.* 2016; 13: 16.
29. Capó X, Martorell M, Busquets-Cortés C, Sureda A, Riera J, Drobic F. (b) Effects of dietary almond- and olive oil-based docosahexaenoic- and vitamin E-enriched beverage supplementation on athletic performance and oxidative stress markers. *Food Funct.* 2016; 7: 4920-34.
30. Carey AL, Steinberg GR, Macaulay SL, Thomas WG, Holmes AG, Ramm G, Prelovsek O, Hohnen-Behrens C, Watt MJ, James DE, Kemp BE, Pedersen BK, Febbraio MA. Interleukin-6 increases insulin-stimulated glucose disposal in humans and glucose uptake and fatty acid oxidation in vitro via AMP-activated protein kinase. *Diabetes* 2006; 55(10): 2688-2697.
31. Cecarini V, Gee J, Fioretti E, Amici M, Angeletti M, Eleuteri AM, Keller JN. Protein oxidation and cellular homeostasis: Emphasis on metabolism. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1773(2): 93-104.
32. Cerny F, Burton H. *Metabolism In: Exercise Physiology for Health Care Professionals. Human Kinetics, Champaign, IL, 2001: 39-57.*
33. Cheung K, Hume PA, Maxwell L. Delayed onset muscle soreness. *Treatment Strategies and Performance Factors. Sports Med.* 2003; 33(2): 145-164.
34. Çimen MY. Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clin Chim Acta* 2008; 390(1- 2): 1-11.
35. Clarkson PM, Hubal MJ. Exercise-induced muscle damage in humans. *Am J Phys Med Rehabil.* 2002; 81(Suppl): 52-69.
36. Close GL, Ashton T, Cable T, Doran D, MacLaren DP. Eccentric exercise, isokinetic muscle torque and delayed onset muscle soreness: the role of reactive oxygen species. *Eur J App Physiol.* 2004; 91(5-6): 615-621.
37. Cohen J. *Statistical power analysis for the behavioral sciences (2nd ed).* Hillsdale, NJ: Lawrence Erlbatun Associates Publishing Co; 1988.

38. Conn JM, Annett JL, Gilchrist J. Sports and recreation related injury episodes in the US population 1997-99. *Inj Prev.* 2003; 9(2): 117-23.
39. Connolly DA, Sayers SP, McHugh MP. Treatment and prevention of delayed onset muscle soreness. *J Strength Cond Res.* 2003; 17(1): 197-208.
40. Cooper G. *The Cell: A Molecular Approach.* 2nd edition. Sinauer Associates, Sunderland (MA), 2000.
41. Coral-Gubler H, Laskin J, Marx BJ, Leonard CT. Construct validity of myotonometric measurements of muscle compliance as a measure of strength, *Physiological Measurement* 2007; 28:, 913-924.
42. Corder KE, Newsham KR, McDaniel JL, Ezekiel UR, Weiss EP. Effects of Short-Term Docosahexaenoic Acid Supplementation on Markers of Inflammation after Eccentric Strength Exercise in Women. *J Sports Sci Med.* 2016; 15(1): 176-183.
43. Deaton CM, Marlin DJ. Exercise associated oxidative stress. *Clin Tech Equine Prac.* 2003; 2(3): 278-291.
44. Decsi T, Csabi G, Torok, K, Erhardt E, Minda H, Burus I, Molnar D. Polyunsaturated fatty acids in plasma lipids of obese children with and without metabolic cardiovascular syndrome. *Lipids* 2000; 35(11): 1179-1184.
45. Dékány M, Nemeskéri V, Györe I, Harbula I, Malomsoki J, Pucsok J. Antioxidant status of interval-trained athletes in various sports. *Int J Sports Med.* 2006; 27(02): 112-116.
46. Delfan M, Ebrahim K, Baesi F. The immunomodulatory effects of fish-oil supplementation in elite paddlers: A pilot randomized double blind placebo-controlled trial. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2015; 99: 35-40.
47. de Sousa CV, Sales MM, Rosa TS, Lewis JE, de Andrade RV, Simões HG. The antioxidant effect of exercise: a systematic review and meta-analysis. *Sports Med.* 2017; 47(2): 277-293.
48. DiLorenzo FM, Drager CJ, Rankin JW. Docosahexaenoic acid affects markers of inflammation and muscle damage after eccentric exercise. *J Strength Cond Res.* 2014; 28(10): 2768-74.
49. Dorfman SE, Laurent D, Gounarides JS, Li X, Mullarkey TL, Rocheford EC i wsp. Metabolic implications of dietary trans-fatty acids. *Obesity (Silver Spring).* 2009; 17(6): 1200-7.
50. Doggrell S. Lyprinol – is it a useful Anti – inflammatory Agent? *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011; 2011: 1-7.

51. Dyerberg J, Eskesen D, Andersen P. Effects of *trans*- and n-3 unsaturated fatty acids on cardiovascular risk markers in healthy males. An 8 weeks dietary intervention study. *Eur J Clin Nutr.* 2004; 58: 1062-1070.
52. Ebele IJ, Jennifer IA, Nnabugo EC, Sidney OI, Chibuike OK, Chukwuma OO, Daniel N, Anayochukwu EA. Oxidative stress/lipid peroxidation and antioxidant enzymes in apparently healthy individuals involved in physical exercise. *Asian J Med Sci.* 2016; 796(6): 16-19.
53. Emed L, Passaglia D, Guerios S, João P, Moser A, Abdalla D, Guarita-Souza L, Mikilita E, Baena C, da Costa A, Faria-Neto J. Acute modification in plasma lipid levels in ultramarathon runners. *J Sports Sci.* 2015; 29: 1-5.
54. Enoka R, Duchateau J.: Muscle fatigue: what, why and how it influences muscle function. *Am. J. Physiol.* 2008; 586(1): 11-23.
55. El-Beltagi HS, Mohamed HI. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and antioxidative defense mechanism. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 2013; 41(1): 44-57.
56. Eston RG, Mickleborough J, Baltzopoulos V. Eccentric activation and muscle damage: biomechanical and physiological considerations during downhill running, *Br J Sports Med.* 1995; 29(2): 89-94.
57. Esquiús L, García-Retortillo S, Balagué N. Physiological- and performance-related effects of acute olive oil supplementation at moderate exercise intensity. *J Int Soc Sports Nutr.* 2019; 16: 12.
58. Farzaneh-Far R, Lin J, Epel ES. Association of Marine Omega-3 Fatty Acid Levels With Telomeric Aging in Patients With Coronary Heart Disease. *JAMA.* 2010; 303 (3): 250-257.
59. Febbraio MA, Steensberg A, Keller C, Starkie RL, Nielsen HB, Krstrup P, Ott P, Secher NH, Pedersen BK. Glucose ingestion attenuates interleukin-6 release from contracting skeletal muscle in humans. *J Physiol.* 2003; 549(2): 607-612.
60. Fedawa MV, Hathaway ED, Ward-Ritacco CL. Effect of exercise training on C-reactive protein: a systematic review and meta-analysis of randomised and non-randomised controlled trials. *Br J Sports Med.* 2017; 51(8): 670-676.
61. Filaire E, Massart A, Portier H, Rouveix M, Rosado F, Bage AS, Gobert M, Durand D. Effect of 6 weeks of n-3 fatty-acid supplementation on oxidative stress in judo athletes. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 2010; 20(6): 496-506.

62. Finaud J, Lac G, Filaire E. Oxidative stress. *Sports Med.* 2006; 36 (4): 327-358.
63. Fischer CP. Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance? *Exerc Immunol Rev.* 2006; 12: 6-33.
64. Fisher-Wellman K, Bloomer RJ. Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dyn Med.* 2009; 8 (1): 1-10.
65. Flachs P, Horakova O, Brauner P. Polyunsaturated fatty acids of marine origin upregulate mitochondrial biogenesis and induce beta-oxidation in white fat. *Diabetologia* 2005; 48(11): 2365-2375.
66. Freund W, Weber F, Billich C, Birklein F, Breimhorst M, Schuetz UH. Ultra-marathon runners are different: investigations into pain tolerance and personality traits of participants of the TransEurope FootRace 2009. *Pain Pract.* 2013; 13: 524-532.
67. Gaetani GF, Galiano S, Canepa L, Ferraris AM, Kirkman HN. Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. *Blood* 1989; 73(1): 334-339.
68. Gammone MA, Riccioni G, Parrinello G, D'Orazio N. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids: Benefits and Endpoints in Sport. *Nutrients* 2018; 11(1).
69. Ganio MS, Klau JF, Casa DJ, Armstrong LE, Maresh CM. Effect of caffeine on sport-specific endurance performance: a systematic review. *J Strength Cond Res.* 2009; 23(1): 315-324.
70. Ghiasvand R, Djalali M, Djazayery S, Keshavarz S, Hosseini M, Askari G, Jani N, Fardad N, Fatehi F. Effect of eicosapentaenoic Acid (EPA) and vitamin e on the blood levels of inflammatory markers, antioxidant enzymes, and lipid peroxidation in Iranian basketball players. *Iran J Public Health.* 2010; 39(1): 15-21.
71. Giandolini M, Gimenez P, Temesi J. Effect of the Fatigue Induced by a 110-km Ultramarathon on Tibial Impact Acceleration and Lower Leg Kinematics. *PLoS One.* 2016; 11(3).
72. Gieremek K, Dec L. Zmęczenie i regeneracja sił – odnowa biologiczna, Hasmed, Katowice 2010.
73. Gomez-Cabrera MC., Domenech E, Viña J. Moderate exercise training is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radic Biol Med.* 2008; 44(2): 126-131.

74. Gorzynik-Debicka M, Przychodzen P, Cappello F, Kuban-Jankowska A, Marino Gammazza A, Knap N. Potential health benefits of olive oil and plant polyphenols. *Int J Mol Sci.* 2018; 19: 547.
75. Gravina L, Brown FF, Alexander L, Dick JR, Bell JG, Witard O & Galloway SD (2017) n-3 Fatty Acid Supplementation During 4 Weeks of Training Leads to Improved Anaerobic Endurance Capacity, But Not Maximal Strength, Speed, or Power in Soccer Players. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism* 2017; 27(4): 305-313.
76. Gray P, Chappell A, Jenkinson AM, Thies F, Gray SR. Fish oil supplementation reduces markers of oxidative stress but not muscle soreness after eccentric exercise *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 2014; 24 (2): 206-214.
77. Hadžović-Džuvo A, Valjevac A, Lepara O, Pjanić S, Hadžimuratović A, Mekić A. Oxidative stress status in elite athletes engaged in different sport disciplines. *Bosn J Basic Med Sci.* 2014; 14(2): 56-62.
78. Halson SL, Lancaster GI, Jeukendrup AE, Gleeson M. Immunological responses to overreaching in cyclists. *Med Sci Sports Exerc.* 2003; 35(5): 854-861.
79. Hawley JA . Adaptations of skeletal muscle to prolonged, intense endurance training. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2002; 29: 218-222.
80. Hejazi K, Hosseini SRA. Influence of selected exercise on serum immunoglobulin, testosterone and cortisol in semi-endurance elite runners. *Asian J Sports Med* 2012; 3(3):185-192.
81. Hersh Shain A. Characterization of the flexor digitorum superficialis as a predictor of grasping strength. New Brunswick, New Jersey 2009.
82. Heshmati J, Morvaridzadeh M, Maroufizadeh S, Akbari A, Yavari M, Amirinejad A, Maleki-Hajiagha A, Sepidarkish M. Omega-3 fatty acids supplementation and oxidative stress parameters: A systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Pharmacol Res.* 2019; 149: 104462.
83. Hingley L, Macartney MJ, Brown MA, McLennan PL, Peoples GE. DHA-rich Fish Oil Increases the Omega-3 Index and Lowers the Oxygen Cost of Physiologically Stressful Cycling in Trained Individuals. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 2017; 27(4): 335-343.
84. Hirose L, Nosaka K, Newton M, Laveder A, Kano M, Peake J, Suzuki K. Changes in inflammatory mediators following eccentric exercise of the elbow flexors. *Exerc Immunol Rev.* 2004; 10: 75- 90.

85. Ho M, Maple C, Bancroft M, McLaren M, Belch JJ. The Beneficial effect of omega-3 and omega-6 essential fatty acid supplementation on red blood cell rheology. *PLEFA* 1999; 61: 13-17.
86. Hoffman M. Injuries and health considerations in ultramarathon runners. *Phys Med Rehabil Clin N. Am.* 2016; 27(1): 203-16.
87. Hoffman M, Badowski N, Chin J, Stuempfle K, Parise C. Determinants of recovery from a 161-km ultramarathon. *J Sports Sci.* 2016; 11: 1-9.
88. Hood DA, Irrcher I, Ljubicic V, Joseph AM. Coordination of metabolic plasticity in skeletal muscle. *J Exp Biol.* 2006; 209: 2265-2275.
89. Hortobagyi T, Houmard J, Fraser D. Normal forces and myofibrillar disruption after repeated eccentric exercise. *J Appl Physiol.* 1998; 84: 492-498.
90. Houghton D, Onambele GL. Can a standard dose of eicosapentaenoic acid (EPA) supplementation reduce the symptoms of delayed onset of muscle soreness? *J Int Soc Sports Nutr.* 2012; 9: 2.
91. Hulbert AJ, Turner N, Storlien, LH, Else PL. Dietary fats and membrane function: implications for metabolism and disease. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2005; 80(1): 155-169.
92. Hume P. A., Cheung K., Maxwell L.: DOMS: An overview of treatment strategies, *Int J Sport Med.* 2004; 2(5): 124-136.
93. Illei GG, Lipsky PE. Novel, antigen-specific therapeutic approaches to autoimmune/inflammatory diseases. *Curr Opin Immunol.* 2000; 12: 712-718.
94. Jagier A, Nazar K, Dziak A. *Medycyna sportowa, PZWL, Warszawa* 2013.
95. Jakeman JR, Lambrick DM, Wooley B, Babraj JA, Faulkner JA. Effect of an acute dose of omega-3 fish oil following exercise-induced muscle damage. *Eur J Appl Physiol.* 2017; 117: 575-582.
96. Järvinen TA, Järvinen M, Kalimo H. Regeneration of injured skeletal muscle after the injury. *Muscles Ligaments Tendons J.* 2013; 3(4): 337-345.
97. Jaskolska A, Bogucka R, Świstak A. Następstwa opóźnionej bolesności mięśni szkieletowych. *Medicina Sportiva* 2002; 6(4): 189-201.
98. Jastrzębski Z, Żychowska M, Konieczna A, Ratkowski W, Radziwiński Ł. Changes in the acid-base balance and lactate concentration in the blood in amateur ultramarathon runners during a 100-km run. *Biol Sport.* 2015; 32(3): 261-265.

99. Jeromson S, Gallagher IJ, Galloway SD, Hamilton DL. Omega-3 fatty acids and skeletal muscle health. *Mar Drugs* 2015; 13: 6977-7004.
100. Jeukendrup AE. Nutrition for endurance sports: Marathon, triathlon, and road cycling, *J Sports Sci.* 2011; 29(1): 91-99.
101. Jouris KB, McDaniel JL, Weiss EP. The Effect of Omega-3 Fatty Acid Supplementation on the Inflammatory Response to eccentric strength exercise. *J Sports Sci Med.* 2011; 10(3): 432-438.
102. Joyner MJ, Coyle EF. Endurance exercise performance: the physiology of champions. *J Physiol.* 2008; 586(1): 35-44.
103. Jówko E, Długołęcka B, Makaruk B, Cieśliński I. The effect of green tea extract supplementation on exercise-induced oxidative stress parameters in male sprinters. *Eur J Nutr.* 2015; 54: 783-791.
104. Kanda K, Sugama K, Hayashida H, Sakuma J. Eccentric exercise-induced delayed-onset muscle soreness and changes in markers of muscle damage and inflammation *Exerc Immun Rev.* 2013, 19: 72-85.
105. Kao W, Hou S, Chiu Y, Chou S, Kuo F, Wang S, Chen J. Effects of 100-km ultramarathon on acute kidney injury. *Clin J Sport Med.* 2015; 25(1): 49-54.
106. Kaye JM, Lightman SL. Psychological stress and endocrine axes. *Hum Psychoneuroimmunol* 2005; 25-52.
107. Khodae M, Ansari M. Common ultramarathon injuries and illnesses: race day management. *Curr Sports Med Rep.* 2012; 11(6): 290-297.
108. Khodae M, Spittler J, VanBaak K et al. Effects of running an ultramarathon on cardiac, hematologic, and metabolic biomarkers. *Int J Sports Med.* 2015; 36(11): 867-71.
109. Kim J, Lee J. A review of nutritional intervention on delayed onset muscle soreness. Part I. *J Exerc Rehabil.* 2014; 10(6): 349-356.
110. Kłapcińska B, Waśkiewicz Z, Chrapusta S, Sadowska-Krępa E, Czuba M, Langfort J. Metabolic responses to a 48-h ultra-marathon run in middle-aged male amateur runners. *Eur J App Physiol.* 2013; 113: 2781-2793.
111. Knechtle B., Nikolaidis P. Ultra-marathon running. *Dansk Sportsmedicin* 2015; 19(4): 6-10.
112. Komulainen J., Koskinen S.O., Kalliokoski R.: Gender differences in skeletal muscle fiber damage after eccentrically biased downhill running in rats, *Acta Physiology Scandinavia* 1999; 165: 57-63.

113. Kosmidou I, Vassilakopoulos T, Xagorari A, Zakynthinos S, Papapetropoulos A, Roussos C. Production of interleukin-6 by skeletal myotubes: role of reactive oxygen species. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002; 26(5): 587-593.
114. Kris-Etherton PM, Grieger JA, Etherton TD. Dietary reference intakes for DHA and EPA. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2009; 81(2-3): 99-104.
115. Kuehl KS, Perrier, ET, Elliot DL. Efficacy of tart cherry juice in reducing muscle pain during running: a randomized controlled trial. *J Int Soc Sports Nutr.* 2010; 7: 17.
116. Kyriakidou Y, Wood C, Ferrier C. The effect of Omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on exercise-induced muscle damage. *J Int Soc Sports Nutr.* 2021; 18: 9.
117. Landmesser U, Drexler H. Toward understanding of extracellular superoxide dismutase regulation in atherosclerosis a novel role of uric acid? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22(9): 1367-1368.
118. Latham J, Campbell D, Nichols W, Mott T. Clinical inquiries. How much can exercise raise creatine kinase level--and does it matter? *J Family Prac.* 2008; 57(8): 545-547.
119. Larsen HB. Kenyan dominance in distance running *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2003; 136(1): 161-70.
120. Leaf DA, Kleinman MT, Hamilton M, Barstow TJ. The effect of exercise intensity on lipid peroxidation. *Med Sci Sports Exerc.* 1997; 29(8): 1036-1039.
121. Lembke P, Capodice J, Hebert K, Swenson T. Influence of omega-3 (n3) index on performance and wellbeing in young adults after heavy eccentric exercise. *J Sports Sci Med.* 2014; 13(1):151-156.
122. Lenn J, Uhl T, Mattacola C, Boissonneault G, Yates J, Ibrahim W, Bruckner G. The effects of fish oil and isoflavones on delayed onset muscle soreness. *Med Sci Sports Exerc.* 2002; 34: 1605-1613.
123. Leonard CT, Deshner WP, Romo JW, Suoja ES, Fehrer SC, Mikhailenok EL. Myotonometer intra- and interrater reliabilities. *Med Reh.* 2003; 84: 928-932.
124. Levine BD. $\dot{V}O_2$ max: what do we know, and what do we still need to know? *J Physiol.* 2008; 586(1): 25-34.
125. Lewitt A, Mądro E, Krupienicz A. Podstawy teoretyczne i zastosowania analizy impedancji bioelektrycznej (BIA) *Endokrynol Otył Zab Przem Mat.* 2007;2(4): 79-84.
126. Liu G, Mac Gabhann F, Popel AS. Effects of fiber type and size on the heterogeneity of oxygen distribution in exercising skeletal muscle. *PLoS One.* 2012; 7(9): e44375.
127. Lopes A.D., Hespanhol L.C., Yeung S.S. What are the Main Running-Related Musculoskeletal Injuries?. *Sports Med* 2012, 42: 891-905.

128. Lushchak VI. Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. *J Amino Acids* 2012; 1-26.
129. Lv ZT, Zhang JM, Zhu WT. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid Supplementation for Reducing Muscle Soreness after Eccentric Exercise: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Biomed Res Int.* 2020; 20: 8062017
130. MacDonald C, Wojtaszewski JFP, Pedersen BK, Kiens B, Richter EA. Interleukin-6 release from human skeletal muscle during exercise: relation to AMPK activity. *J Appl Physiol.* 2003; 95(6): 2273-2277.
131. MacMahon C, Schiicker L, Hagemann N, Strauss B. Cognitive fatigue effects on physical performance during running. *J Sport Exerc Psychol.* 2014; 36(4): 375-81.
132. Mairböurl H. Red blood cells in sports: effects of exercise and training on oxygen supply by red blood cells. *Front Physiol.* 2013; 4: 332.
133. Mani S, Lawson JW. In vitro modulation of inflammatory cytokine and IgG levels by extracts of *Perna canaliculus*. *BMC Compl Alt Med.* 2006; 6: 1.
134. Manley AF. Physiologic Responses and Long-Term Adaptations to Exercise. *Physical Activity and Health: A Report of the Surgeon General.* Centers for Disease Control and Prevention. 1999; 71: 62-66.
135. Margaritelis NV, Theodorou AA, Baltzopoulos V, Maganaris CN, Paschalis V, Kyparos A, Nikolaidis MG. Muscle damage and inflammation after eccentric exercise: can the repeated bout effect be removed? *Physiol Rep.* 2015; 3(12): e12648.
136. Markert CL. Lactate dehydrogenase. Biochemistry and function of lactate dehydrogenase. *Cell Biochem Funct.* 1984; 2(3): 131-134.
137. Martorell M, Capó X, Sureda A. Effect of DHA on plasma fatty acid availability and oxidative stress during training season and football exercise. *Food Funct.* 2014; 5(8): 1920-1931.
138. Martin V, Kerhervé H, Messonnier LA, Banfi J-C, Millet GY. Central and peripheral contributions to neuromuscular fatigue induced by a 24-h treadmill run. *J App Physiol.* 2010; 108(5): 1224-1233.
139. Mastaloudis A, Morrow J, Hopkins D, Devaraj S, Traber M. Antioxidant supplementation prevents exercise-induced lipid peroxidation, but not inflammation, in ultramarathon runners. *Free Radic Biol Med.* 2004; 36(10): 1329-1341.
140. McCarthy DA, Perry JD, Melsom RD, Dale MM. Leucocytosis induced by exercise. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1987; 295(6599): 636.

141. McComb S, Thiriot A, Krishnan L, Stark F. Introduction to the immune system. *Methods Mol Biol* 2013; 1061: 1-20.
142. McGlory, C, Wardle SL, Macnaughton LS, Witard OC, Scott F, Dick J, Tipton, KD. Fish oil supplementation suppresses resistance exercise and feeding-induced increases in anabolic signaling without affecting myofibrillar protein synthesis in young men. *Physiol Rep.* 2016; 4(6): e12715.
143. McGlory C, Calder PC, Nunes EA. The Influence of Omega-3 Fatty Acids on Skeletal Muscle Protein Turnover in Health, Disuse, and Disease. *Frontiers in Nutrition.* 2019 ;6:144.
144. McMurry J. *Chemia organiczna cz. 2*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2005.
145. McPhee S, Hodges LD, Wright PFA, Wynne PM, Kalafatis N, Harney DW, Macrides TA. Anti-cyclooxygenase effects of lipid extracts from the New Zealand green-lipped mussel, *Perna canaliculus*. *Comp. Bioch. Physiol. B.* 2007; 146(30): 346-356.
146. Mickleborough TD, Murray RL, Ionescu AA, Lindley MR. Fish oil supplementation reduces severity of exercise-induced bronchoconstriction in elite athletes. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003; 168(10): 1181-1189.
147. Mickleborough T, Sinex J, Platt D, Chapman R, Hirt M. The effects PCSO-524[®], a patented marine oil lipid and omega-3 PUFA blend derived from the New Zealand green lipped mussel (*Perna canaliculus*), on indirect markers of muscle damage and inflammation after muscle damaging exercise in untrained men: a randomized, placebo controlled trial. *J Int Soci Sports Nutrit.* 2015; 12: 10-27.
148. Milewska M, Grzelkowska-Kowalczy K. Znaczenie cytokin prozapalnych i czynników wzrostu w regeneracji mięśni szkieletowych. *Med Weter* 2016; 72(8): 472-478.
149. Millard-Staford ML, Childers WL, Conger SA, Kampfer A, Rahnert JA. Recovery nutrition: timing and composition after endurance exercise. *Curr. Sports Med. Rep.* 2008; 7 (4): 193-201.
150. Millet GP, Millet GY. Ultramarathon is an outstanding model for the study of adaptive responses to extreme load and stress. *BMC Med.* 2012; 10: 77.
151. Mirończuk-Chodakowska I, Witkowska AM, Zujko ME. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Adv Med Sci.* 2018; 63(1): 68-78.
152. Mozaffarian D, Katan MB, Ascherio A, Stampfer MJ, Willett WC. Trans Fatty Acids and Cardiovascular Disease. *N Engl J Med.* 2006; 354: 1601-1613.
153. Mozaffarian D, Aro A, Willett WC. Health effects of trans-fatty acids: experimental and observational evidence. *Eur J Clin Nutr.* 2009; 63: 5-21.

154. Mrakic-Sposta S, Gussoni M, Moretti S, et al. Effects of mountain ultra-marathon running on ROS production and oxidative damage by micro-invasive analytic techniques, *PLoS One*. 2015; 10(11): e0141780.
155. Murase S, Terazawa E, Queme F, Ota H, Matsuda T, Hirate K, Kozaki Y, Katanosaka K, Taguchi T, Urai H, Mizumura K. Bradykinin and nerve growth factor play pivotal roles in muscular mechanical hyperalgesia after exercise (delayed-onset muscle soreness). *J Neurosci*. 2010; 30(10): 3752-3761.
156. Murphy KJ, Mooney BD, Mann NJ, Nichols PD, Sinclair AJ. Lipid, FA, and sterol composition of New Zealand green lipped mussel (*Perna canaliculus*) and Tasmanian blue mussel (*Mytilus edulis*). *Lipids*. 2002; 37: 6: 587–595.
157. Nicpoń KW. Bóle mięśniowe i kurcze bolesne w praktyce neurologa. *Pol Przegl Neurol*. 2007; 3(4): 237-248.
158. Nieman DC, Henson DA, McAnulty SR, McAnulty L, Swick NS, Utter AC, Vinci DM, Opiela SJ, Morrow JD. Influence of vitamin C supplementation on oxidative and immune changes after an ultramarathon. *J Appl Physiol*. 2002; 92: 1970-1977.
159. Nieman DC, Nehlsen-Cannarella SL, Fagoaga OR, Henson DA, Utter A, Davis JM, Williams F, Butterworth DE. Influence of mode and carbohydrate on the cytokine response to heavy exertion. *Med Sci Sports Exerc*. 1998; 30(5): 671-678.
160. Niki E, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N. Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition and biological effects. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 338(1): 668-676.
161. Noakes TD. Physiological models to understand exercise fatigue and the adaptations that predict or enhance athletic performance. *Scand. J. Med. Sci. Sports*. 2000; 10: 123-145.
162. Noakes T.D. The limits of endurance exercise. *Basic Res Cardiol*. 2006; **101**: 408–417.
163. Nosaka K., Clarkson P. M.: Changes in indicators of inflammation after eccentric exercise of the elbow flexors. *Med Sci Sports Exerc*. 1996; 28: 931-961.
164. Nosaka K, Newton M, Sacco P. Delayed-onset muscle soreness does not reflect the magnitude of eccentric exercise-induced muscle damage. *Scand J Med Sci Sports*. 2002; 12(6): 337-346.
165. Ochi E, Tsuchiya Y. Eicosapentaenoic Acid (EPA) and Docosahexaenoic Acid (DHA) in Muscle Damage and Function. *Nutrients* 2018; 10: 552.
166. Ostrowski K, Rohde T, Asp S, Schjerling P, Pedersen BK. Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. *J Physiol*. 1999; 515(1): 287-291.

167. Pandorf C, Haddad F, Wright C, Bodell P, Baldwin K. Differential epigenetic modifications of histones at the myosin heavy chain genes in fast and slow skeletal muscle fibers and in response to muscle unloading. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2009; 297: 6-16.
168. Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F.: Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta* 2003; 333(1): 19-39.
169. Pedersen BK., Hoffman-Goetz L. Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. *Physiol Rev.* 2000; 80(3):1055-1081.
170. Pedersen BK, Steensberg A, Keller P, Keller C, Fischer C, Hiscock N, van Hall G, Plomgaard P, Febbraio MA. Muscle- -derived interleukin-6: lipolytic, anti-inflammatory and immune regulatory effects. *Eur J Physiol.* 2003; 446(1): 9-16.
171. Petersen A, Pedersen B. The role of IL-6 in mediating the anti inflammatory. *J Physiol Pharmacol.* 2006; 57(10): 43-51.
172. Petrović J, Stanić D, Dmitrašinović G, Plećaš-Solarović B, Ignjatović S, Batinić B, Popović D, Pešić V. Magnesium supplementation diminishes peripheral blood lymphocyte DNA oxidative damage in athletes and sedentary young man. *Oxid Med Cell Longev.* 2016; 2016: 2019643.
173. Phillips T, Childs AC, Dreon DM, Phinney S, Leeuwenburgh C. A dietary supplement attenuates il-6 and crp after eccentric exercise in untrained males. *Med Sci Sports Exerc.* 2003; 35: 2032-2037.
174. Philpott JD, Donnelly C, Walshe IH, MacKinley EE, Dick J, Galloway SDR, Tipton KD, Witard OC. Adding Fish Oil to Whey Protein, Leucine, and Carbohydrate Over a Six-Week Supplementation Period Attenuates Muscle Soreness Following Eccentric Exercise in Competitive Soccer Players. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 2018; 28(1): 26-36.
175. Philpott JD, Witard OC, Galloway SD. Applications of omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation for sport performance. *Res Sports Med.* 2019; 27(2): 219-237.
176. Powers SK, Jackson MJ. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physil Rev.* 2008; 88 (4): 1243-1276.
177. Powers SK, Ji LL, Kavazis AN, Jackson MJ. (a) Reactive oxygen species: impact on skeletal muscle. *Compr Physiol.* 2011; 1(2):941-969.
178. Powers SK., Talbert EE., Adhihetty PJ. (b) Reactive oxygen and nitrogen species as intracellular signals in skeletal muscle. *J Physiol.* 2011; 589(9): 2129-2138.

179. Powers S.K., Radak Z., Ji L.L. Exercise-induced oxidative stress: past, present and future. *J Physiol.* 2016; 594(18): 5081-5092.
180. Proske U, Morgan DL. Muscle damage from eccentric exercise: mechanism, mechanical signs, adaptation and clinical applications. *J Physiol.* 2001; 537(2): 333–345.
181. Pumpa KL, Fallon KE, Bensoussan A, Papalia S. The effects of Lyprinol(®) on delayed onset muscle soreness and muscle damage in well trained athletes: a double-blind randomised controlled trial. *Complement Ther Med.* 2011; 19(6): 311-318.
182. Radak Z, Chung HY, Koltai E, Taylor AW, Goto S. Exercise, oxidative stress and hormesis. *Ageing Res Rev.* 2008; 7 (1): 34-42.
183. Ramos-Campo DJ, Ávila-Gandía V, Alacid F, Soto-Mendez F, Alcaraz PE, Lopez-Roman FJ, Rubio-Arias J. Muscle damage, physiological changes, and energy balance in ultra-endurance mountain-event athletes. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2016; 41(8): 872-878.
184. Rawson ES, Miles MP, Larson-Meyer DE. Dietary supplements for health, adaptation, and recovery in athletes. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 2018;28:188–99.
185. Reihmane D, Dela F. Interleukin-6: possible biological roles during exercise. *Eur J Sport Sci* 2014; 14(3): 242-250.
186. Rizzo M, Gensini F, Fatini C, Manetti P, Pucci N, Capalbo A, Vono MCR, Galanti G. ACE I/D polymorphism and cardiac adaptations in adolescent athletes. *Med Sci Sports Exerc.* 2003; 35: 1986-1990.
187. Rodrigues P, Wassmansdorf R, Salgueirosa F, Macedo H, Bertoli S, Nascimento V, Bobroff D, Wharton L, Lee-Osiecki R. Time-course of changes in indirect markers of muscle damage responses following a 130-km cycling race. *Rev. bras. cineantropom. desempenho hum.* 2016; 18(3): 322-331.
188. Rowbottom DG, Green KJ. Acute exercise effects on the immune system. *Med Sci Sports Exerc.* 2000; 32(7): 396-405.
189. Sadowska-Krępa E, Kłapcińska B, Pokora I, Domaszewski P, Kempa K, Podgórski T. Effects of Six-Week Ginkgo biloba Supplementation on Aerobic Performance, Blood Pro/Antioxidant Balance, and Serum Brain-Derived Neurotrophic Factor in Physically Active Men. *Nutrients* 2017; 9(8): 803.
190. Saunders PU, Pyne DB, Telford RD. Factors Affecting Running Economy in Trained Distance Runners. *Sports Med.* 2004; 34: 465-485.

191. Shaikh PZ. Cytokines and their physiologic and pharmacologic functions in inflammation: A review. *Int J Pharm Life Sci.* 2011; 2(11): 1247-1263.
192. Schwingshacki L, Christoph M, Hoffmann G. Effects of Olive Oil on Markers of Inflammation and Endothelial Function-A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients.* 2015;7(9):7651-7675.
193. Sies H. *Oxidative stress.* Academic Press. New York 1985: 1-8.
194. Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol* 2015; 4:180-183.
195. Silva S, Bronze MR, Figueira ME. Impact of a 6-wk olive oil supplementation in healthy adults on urinary proteomic biomarkers of coronary artery disease, chronic kidney disease, and diabetes (types 1 and 2): a randomized, parallel, controlled, double-blind study. *The American Journal of Clinical Nutrition.* 2015 Jan;101(1):44-54. DOI: 10.3945/ajcn.114.094219.
196. Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *J AM Coll Nutr* 2002; 6: 495-505.
197. Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids and athletics. *Curr Sports Med Rep* 2007, 6: 230–236.
198. Simopoulos AP. Importance of the omega-6/omega-3 balance in health and disease: evolutionary aspects of diet. *World Rev. Nutr. Diet.* 2011; 102: 10–21.
199. Smith GI, Jullian S; Reeds DN, Sinacore DR, Klein S, Mittendorfer B. Fish oil-derived n-3 PUFA therapy increases muscle mass and function in healthy older adults. *Am. J. Clin. Nutr.* 2015, 102, 115–122
200. Smith GI, Atherton P, Reeds DN, Mohammed BS, Rennie MJ, Mittendorfer B. Dietary omega-3 fatty acid supplementation increases the rate of muscle protein synthesis in older adults: A randomized controlled trial. *Am. J. Clin. Nutr.* 2011, 93, 402–412.
201. Sorichter S, Mair J, Koller A, Gebert W, Rama D, Calzolari C, Artner-Dworzak E, Puschendorf B. Skeletal troponin I as a marker of exercise – induced muscle damage. *J. Appl. Physiol.* 1997; 83(4): 1076-1082.
202. Sorichter S, Mair J, Early assessment of exercise induced skeletal muscle injury using plasma fatty acid binding protein. *Br J Sports Med.* 1998; 32(2): 121-124.
203. Sorichter S, Puschendorf B, Mair J. Skeletal muscle injury induced by eccentric muscle action: muscle proteins as markers of muscle fiber injury. *Exerc. Immunol. Rev.* 1999; 5: 5-12.

204. Spirlandeli AL, Deminice R, Jordao AA. Plasma malondialdehyde as biomarker of lipid peroxidation: effects of acute exercise. *Int J Sports Med.* 2014; 35(1): 14-18.
205. Stanisław A. Przystępny kurs statystyki z zastosowaniem Statistica PL na przykładach z medycyny. Modele liniowe i nieliniowe. StatSoft, Kraków 2007.
206. Stupka N, Lowther S, Chorneyko K. Gender differences in muscle inflammation after eccentric exercise. *J Appl Physiol.* 2000; 89: 2325-2332.
207. Suzuki K. Cytokine Response to exercise and its modulation. *Antioxidants (Basel)* 2018; 7(1): 17.
208. Tartibian B, Maleki BH, Abbasi A. The effects of ingestion of omega-3 fatty acids on perceived pain and external symptoms of delayed onset muscle soreness in untrained men. *Clin J Sport Med.* 2009; 19(2): 115-119.
209. Tartibian B, Maleki BH, Abbasi A. Omega-3 fatty acids supplementation attenuates inflammatory markers after eccentric exercise in untrained men. *Clin J Sport Med.* 2011; 21(2): 131-137.
210. Teixeira AM, Borges GF. Creatine kinase: structure and function. *Brazil J Biometric.* 2012; 6(2): 53 - 65.
211. Thielecke F, Blannin A. Omega-3 Fatty Acids for Sport Performance—Are They Equally Beneficial for Athletes and Amateurs? A Narrative Review. *Nutrients* 2020; 12: 3712.
212. Tinsley GM, Gann JJ, Huber SR, Andre TL, La Bounty PM, Bowden RG, Gordon PM, Grandjean PW. Effects of Fish Oil Supplementation on Postresistance Exercise Muscle Soreness. *J Diet Suppl.* 2017; 14(1): 89-100.
213. Tracey KJ, Cerami A. The biology of cachectin/tumor necrosis factor. In Habenicht, A Growth Factors, Differentiation Factors, and Cytokines. Springer-Verlag, Berlin 1990; 356–365.
214. Trappe S, Harber M, Gallagher PA, Slivka D, Minchev K, Whitsett D. Single muscle fiber adaptations with marathon training. *J App Physiol.* 2006; 101(3): 721 - 727.
215. Treschow AP, Hodges LD, Wright PFA, Wynne PM, Kalafatis N, Macrides TA. Novel anti-inflammatory ω -3 PUFAs from the New Zealand green-lipped mussel, *Perna canaliculus*. *Comp. Bioch. Physiol. B.* 2007; 147(4): 645 – 656.
216. Tsuchiya Y, Yanagimoto K, Nakazato K, Hayamizu K, Ochi E. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids-rich fish oil supplementation attenuates strength loss and limited joint range of motion after eccentric contractions: A randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group trial. *Eur J Appl Physiol.* 2016; 116: 1179-1188.

217. Vance D, Vance J. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 4th Edition, Elsevier Science, New York 2002.
218. Van Loon LJC, Greenhaff PL, Constantin-Teodosiu D, Saris WHM, Wagenmakers A JM. The effects of increasing exercise intensity on muscle fuel utilisation in humans. *J Physiol*. 2001; 536(1): 295-304.
219. Visioli F, Franco M, Toledo E. Olive oil and prevention of chronic diseases: Summary of an International conference. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases : NMCD*. 2018 Jul;28(7):649-656.
220. Vollmer-Conna U, Fazou C, Cameron B Li H, Brennan C, Luck L, Davenport T, Wakefiels D, Hickie I, Lloyd A. Production of pro-inflammatory cytokines correlates with the symptoms of acute sickness behaviour in humans. *Psychol Med*. 2004; 34(7): 1289-1297.
221. Walsh NP., Gleeson M, Shephard RJ, Gleeson M, Woods JA, Bishop N, Fleshner M, Green C, Pedersen BK, Hoffman-Goetz L, Rogers CJ, Northoff H, Abbasi A, Simon P. Position statement part one: immune function and exercise. *Exerc Immunol Rev* 2011; 17: 3-63.
222. Wall R, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C. Fatty acids from fish: The anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids. *Nutr. Rev*. 2010; 68: 280-289.
223. Wang Y, Jacome-Sosa MM, Proctor SD. The role of ruminant trans fat as a potential nutraceutical in the prevention of cardiovascular disease. *Food Res Int*. 2012; 46: 460-468.
224. Waśkiewicz Z, Kłapciska B, Sadowska-Krępa E, Kempa K, Kimsa E, Gerasimuk D. Acute metabolic responses to a 24-h ultra-marathon race in male amateur runners. *Eur. J. Appl. Physiol*. 2012; 112(5): 1679-88.
225. Wertz PW. Essential, fatty AIDS and dietary stress. *Toxicol And Health* 2009; 25: 279-283.
226. Whitehouse MW, Macrides TA, Kalafatis N, Betts WH, Haynes DR, Broadbent J. Anti-inflammatory activity of a lipid fraction (Lyprinol) from the NZ green-lipped mussel, *Inflammopharmacology*. 1997; 5(3): 237–246.
227. Wilson JM, Loenneke JP, Wilson JE, Zourdos GJ, Kim JS. The effects of endurance, strength, and power training on muscle fiber type shifting. *J Strength Cond Res* 2012; 26(6): 1724-1729.

228. Yahiaoui L, Gvozdic D, Danialou G, Mack M, Petrof P. CC family chemokines directly regulate myoblast responses to skeletal muscle injury. *J Physiol.* 2008; 586: 3991-4004.
229. Zawadzka M, Michalik J. Polimorfizm genu ACTN3 w sporcie i fizjoterapii = CTN3 gen polymorphism in sport and physiotherapy. *J Educ Health Sport.* 2016; 6(8): 219-226.
230. Zheng XM. Extracellular superoxide dismutase. *Free Radic Biol Med.* 2003; 77: 222.
231. Zivkovic SA, Lacomis D, Klemens PR. Chronic eosinophilic perimyositis with persistent myalgias. *Muscle Nerve* 2002; 25: 461-465.
232. Żbikowska A. Formation and properties of trans fatty acids – a review. *Pol J Food Nutr Sci.* 2010; 60(2): 107-114.
233. Żebrowska A, Mizia-Stec K, Mizia M, Gąsior Z, Poprzęcki S. Omega-3 fatty acids supplementation improves endothelial function and maximal oxygen uptake in endurance-trained athletes. *Eur J Sport Sci.* 2015; 15(4): 305-314.

STRESZCZENIE**SUPLEMENTACJA KOMPLEKSEM LIPIDOWYM A STATUS ANTYOKSYDACYJNY KRWI I WYSTĘPOWANIE BÓLU MIĘŚNIOWEGO U BIEGACZY DŁUGODYSTANSOWYCH**

Bieg ultramaratoński to rodzaj terenowego biegu długodystansowego o charakterze wysiłku wytrzymałościowego z dodatkową komponentą ekscentrycznej pracy mięśni. W treningu biegaczy, oprócz genetycznie uwarunkowanych czynników fizjologicznych, kluczową rolę odgrywają zmiany adaptacyjne wpływające na poprawę wykorzystania tlenowych zasobów energetycznych i tolerancji zmian wywołanych wysiłkiem. Te z kolei przekładają się na poprawę wyniku oraz skrócenie okresu regeneracji.

Znaczne obciążenia jakim poddawani są biegacze powodują z jednej strony mechaniczne zaburzenia mikrostruktury i funkcji elementów włączonych w skurcz włókien mięśniowych, a z drugiej szereg zmian biochemicznych zakłócających równowagę prooksydacyjno-antyoksydacyjną w komórkach. W efekcie dochodzi do uwalniania specyficznych markerów uszkodzenia mięśni do krwi, nasilenia reakcji zapalanej i stresu oksydacyjnego. Zmiany te wpływają na odczuwane zmęczenie i mogą być przyczyną kaskady reakcji ogólnoustrojowych przyczyniających się do występowania zespołu opóźnionej bolesności mięśni. Zawodnicy systematycznie trenujący biegi długodystansowe powszechnie stosują suplementy diety, które pomagają w procesie treningowym i regeneracji. Dowiedziono skuteczność preparatów wzbogaconych w nienasycone kwasy tłuszczowe (PUFA) na zwiększenie tolerancji wysiłków wytrzymałościowych oraz na zdolności regeneracyjne i przeciwzapalne. Lyprinol, ze względu na zawartość EPA i DHA mających podobną strukturę do kwasu arachidonowego, konkuruje z nim i może modulować reakcję zapalną. Zmniejszenie syntezy prostaglandyn i leukotrienów hamuje dalsze niszczenie komórek mięśniowych i ogranicza drażnienie nocyreceptorów.

Głównym celem pracy była ocena wpływu suplementacji kompleksem lipidowym PSCO-524 (*Perna canaliculus L.*) na zawartość kwasów tłuszczowych w krwinkach czerwonych, równowagę prooksydacyjno-antyoksydacyjną krwi, poziom markerów uszkodzenia mięśni i mediatorów stanu zapalnego, a także na poprawę stopnia regeneracji mięśni szkieletowych u biegaczy długodystansowych. W tym celu sformułowano następujące pytania badawcze:

1. Czy suplementacja kompleksem lipidowym (*Perna canaliculus L.*) wpływa na zawartość kwasów tłuszczowych w krwinkach czerwonych u biegaczy długodystansowych?

2. Czy zastosowana w badaniach suplementacja wpływa na równowagę prooksydacyjno antyoksydacyjną, poziom markerów uszkodzenia mięśni i mediatorów stanu zapalnego u biegaczy długodystansowych po wysiłku biegowym z przewagą skurczów ekscentrycznych?
3. Czy suplementacja zastosowanym kompleksem lipidowym wpływa na poprawę regeneracji mięśni szkieletowych tj. obniżenie bólu i napięcia mięśniowego u biegaczy długodystansowych po zastosowanym wysiłku biegowym?

Badania przeprowadzono u 24 zawodników trenujących biegi długodystansowe i startujących w biegach ultramaratońskich w okresie przygotowawczym rocznego cyklu treningowego. Biegacze zostali poinformowani o celu i protokole badań, który uprzednio został zaakceptowany przez lokalną Komisję Bioetyczną ds. Badań Naukowych przy Akademii Wychowania Fizycznego im. J. Kukuczki w Katowicach oraz wyrazili zgodę na udział w projekcie badawczym i spełnili określone kryteria doboru. Eksperyment przebiegał w trzech etapach. W pierwszym etapie dokonano pomiarów antropometrycznych z oceną masy i składu ciała, tętna spoczynkowego i spoczynkowego poboru tlenu (analiza gazometryczna), a także wyznaczenie maksymalnego poboru tlenu (VO_2 max) i uzyskaniem maksymalnego tętna wysiłkowego metodą bezpośrednią. W drugim etapie wszyscy badani wykonali test biegowy o charakterze ekscentrycznym: 30 minut wysiłku biegowego przy 70% VO_{2max} i nachyleniu bieżni pod kątem minus 16 procent. Przed rozpoczęciem wysiłku we krwi oznaczano: indeks kwasów tłuszczowych (HS-Omega-3 Index[®]), wskaźniki równowagi prooksydacyjno – antyoksydacyjnej (dysmutazę ponadtlenkową [SOD], kat [CAT], peroksydazę glutationową [GPx], zredukowany glutation [GSH]), wskaźnik stresu oksydacyjnego (dialdehyd malonowy [MDA]), markery uszkodzeń błon komórek mięśniowych (kinazę kreatynową [CK], dehydrogenazę mleczanową [LDH], troponinę [TnT] i mioglobina [Mb]) i mediatorów stanu zapalnego (IL-6 i TNF- α), a także przeprowadzono ocenę bólu mięśniowego (próg bólu [PT]) i napięcia mięśni kończyn dolnych (obszar pod krzywą [AUC]). Badania zostały powtórzone bezpośrednio po zakończeniu testu, po godzinnym i 24 godzinnym odpoczynku. W etapie trzecim zawodnicy zostali losowo podzieleni na dwie grupy: suplementowaną (SUPL; dzienna dawka: 800 mg oliwy z oliwek, 400 mg stabilizowanego ekstraktu lipidowego zawierającego kwasy tłuszczowe w tym 58mg EPA i 44 mg DHA i 1,8 mg witaminy E) i kontrolną (PL; dzienna dawka: 1200 mg oliwy z oliwek). Po trzech tygodniach przyjmowania zaleconych dawek powtórzono test wysiłkowy o charakterze ekscentrycznym z oznaczeniem wskaźników biochemicznych, bólu mięśniowego i napięcia mięśniowego zgodnie z protokołem drugiego etapu badań.

Po dokonaniu analizy uzyskanych wyników sformułowano następujące wnioski:

1. Trzytygodniowe przyjmowanie kompleksu lipidowego w ilości 1200 mg dziennie nie obniżyło poziomu kwasów tłuszczowych nasyconych i tłuszczów TRANS w krwinkach czerwonych badanych biegaczy. Suplementacja wywołała korzystne zmiany stosunku AA/EPA. Obserwowane większe obniżenie wskaźnika w grupie suplementowanej może wynikać zarówno z zawartości świadczy kwasu eikozapentaenowego w przyjmowanym kompleksie jak i z jego hamującego wpływu na metabolizm kwasu arachidonowego.
2. Suplementacja kompleksem lipidowym nie wpłynęła znacząco na równowagę prooksydacyjno-antyoksydacyjną, poziom markerów uszkodzenia mięśni i mediatorów stanu zapalnego u badanych biegaczy. Wśród badanych enzymów antyoksydacyjnych najkorzystniejsze zmiany obserwowano jedynie w aktywności dysmutazy ponadtlenkowej bezpośrednio po i w pierwszej godzinie po wysiłku.
3. Zaobserwowano korzystny wpływ suplementu na poziom odczuwanego bólu i napięcia mięśniowego przy użyciu zastosowanych narzędzi pomiarowych. W przypadku bólu mięśniowego charakterystyczne dla grupy przyjmującej kompleks lipidowy są rosnące, w stosunku do wcześniejszych pomiarów, wartości prognozy bólu w 24 godzinie. Dodatkowo znaczne obniżenie napięcia mięśniowego w pomiarach spoczynkowych i bezpośrednio po wysiłku, a także stosunkowo wysokie poziomy AUC w ostatnim pomiarze, wskazujące na niższe napięcie mięśniowe, mogą świadczyć o korzystnym wpływie suplementu na przebieg procesu regeneracji.
4. W celu zbadania dokładniejszego wpływu kompleksu lipidowego na przebieg regeneracji mięśniowej, a przede wszystkim wystąpienie opóźnionej bolesności mięśniowej konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań rozszerzonych o pomiary w 48 i 72 godzinie.

SUMMARY**LIPID COMPLEX SUPPLEMENTATION VERSUS BLOOD ANTIOXIDANT STATUS AND INCIDENCE OF MUSCLE SORENESS IN LONG-DISTANCE RUNNERS**

Ultramarathon running is a type of off-road long-distance endurance run with an added component of eccentric muscle work. In addition to genetically determined physiological factors, adaptive changes that improve the utilization of aerobic energy stores and tolerance of exercise-induced changes play a key role in runner training. These in turn translate into improved performance and a shorter recovery period.

Significant strain to which runners are subjected causes, on the one hand, mechanical disorders of the microstructure and function of the elements involved in muscle fiber contraction, and on the other hand, a number of biochemical changes disrupting the prooxidation-antioxidation balance in cells. This results in the release of specific markers of muscle damage into the blood, increasing the inflammatory response and oxidative stress. These changes affect perceived fatigue and can trigger a cascade of systemic reactions contributing to delayed muscle soreness syndrome. Athletes who regularly train for long-distance running commonly use nutritional supplements to aid in the training and recovery process. The effectiveness of formulations enriched in unsaturated fatty acids (PUFAs) on increasing endurance exercise tolerance and on recovery and anti-inflammatory abilities has been proven. Lyprinol, due to its content of EPA and DHA having a similar structure to arachidonic acid, competes with it and may modulate the inflammatory response. Reducing prostaglandin and leukotriene synthesis inhibits further muscle cell destruction and reduces nociceptor irritation. The main objective of this study was to evaluate the effects of supplementation with the lipid complex PSCO-524 (*Perna canaliculus L.*) on red blood cell fatty acid content, blood prooxidant-antioxidant balance, levels of muscle damage markers and inflammatory mediators, as well as improved skeletal muscle recovery in long-distance runners. To this end, the following research questions were formulated:

1. Does lipid complex (*Perna canaliculus L.*) supplementation affect red blood cell fatty acid content in long-distance runners?
2. Does the supplementation used in the study affect the prooxidant-antioxidant balance, levels of muscle damage markers and inflammatory mediators in long-distance runners after running exercise with predominantly eccentric contractions?

3. Does supplementation with an applied lipid complex improve skeletal muscle recovery, i.e., reduce muscle pain and tension in long-distance runners after applied running exercise?

The study was conducted in 24 athletes training in long-distance running and competing in ultramarathon running during the preparatory period of the annual training cycle. The runners were informed of the purpose and protocol of the study, which had previously been approved by the local Bioethics Committee for Scientific Research at the Jerzy Kukuczka Academy of Physical Education in Katowice and agreed to participate in the research project and met the specified selection criteria. The experiment was conducted in three stages. In the first stage, anthropometric measurements with assessment of body weight and composition, resting heart rate and resting oxygen uptake (gasometric analysis), as well as determination of maximal oxygen uptake (VO_2 max) and obtaining maximal exercise heart rate by direct method were performed. In the second stage, all subjects performed an eccentric running test: 30 minutes of running exercise at 70% VO_2 max and a treadmill incline of minus 16 percent. Prior to exercise, the following blood parameters were determined: fatty acid index (HS-Omega-3 Index®), indicators of prooxidant-antioxidant balance (superoxide dismutase [SOD], CAT [CAT], glutathione peroxidase [GPx], reduced glutathione [GSH]), oxidative stress index (malondialdehyde [MDA]), markers of muscle cell membrane damage (creatine kinase [CK], lactate dehydrogenase [LDH], troponin [TnT], and myoglobin [Mb]) as well as inflammatory mediators (IL-6 and TNF- α), and muscle pain (pain threshold [PT]) and lower limb muscle tone (area under the curve [AUC]) were assessed. The tests were repeated immediately after the test, after one hour and 24 hours of rest. In stage 3, athletes were randomly divided into two groups: supplemented (SUPL; daily dose: 800 mg olive oil, 400 mg stabilized lipid extract containing fatty acids including 58 mg EPA and 44 mg DHA and 1.8 mg vitamin E) and control (PL; daily dose: 1200 mg of olive oil). After three weeks of taking the prescribed doses, the eccentric exercise test with determination of biochemical indices, muscle pain and muscle tone was repeated according to the protocol of the second stage of the study.

After analyzing the results obtained, the following conclusions were made:

1. Three-week intake of the lipid complex at 1200 mg per day did not reduce levels of saturated fatty acids and TRANS fats in the red blood cells of the study runners. Supplementation induced beneficial changes in the AA/EPA ratio. The observed greater reduction in the index in the supplemented group may be due to both the presence of eicosapentaenoic acid in the ingested complex and its inhibitory effect on arachidonic acid metabolism.
2. Supplementation with the lipid complex did not significantly affect the prooxidant-antioxidant balance, levels of muscle damage markers, and inflammatory mediators in the

study runners. Among the antioxidant enzymes studied, the most favorable changes were observed only in superoxide dismutase activity immediately after and in the first hour after exercise.

3. A beneficial effect of the supplement on levels of perceived pain and muscle tone was observed using the measurement tools used. For muscle pain, increasing pain threshold values at 24 hours are characteristic of the group taking the lipid complex compared to previous measurements. Additionally, the significant reduction in muscle tone in resting and immediate post-exercise measurements, as well as the relatively high AUC levels in the last measurement, indicating lower muscle tone, may indicate a beneficial effect of the supplement on the recovery process.
4. In order to investigate further the effect of the lipid complex on the course of muscle recovery and especially the occurrence of delayed muscle soreness, further studies extended by measurements at 48 and 72 hours are needed.

WYKAZ TABEL:

Tabela 1:

Indywidualne spożycie podstawowych składników pokarmowych (B-białka, T-tłuszcze, W-węglowodany), witamin oraz kwasów tłuszczowych nasyconych i nienasyconych oszacowane na podstawie kwestionariuszy Dietus, (B.U.I. InFit. Warszawa, Polska)

Tabela 2:

Zróżnicowanie poziomu wskaźników równowagi prooksydacyjno-antyoksydacyjnej po wysiłku fizycznym i suplementacji kompleksem lipidowym.

Tabela 3:

Aktywność kinazy kreatynowej (CK) i dehydrogenazy mleczanowej(LDH) oraz stężenie troponiny (TnT) i mioglobiny (Mb) po wysiłku fizycznym i suplementacji kompleksem lipidowym.

Tabela 4:

Zróżnicowanie poziomu mediatorów stanu zapalnego po wysiłku fizycznym i suplementacji kompleksem lipidowym.

Tabela 5:

Zróżnicowanie progu bólu mięśni czworogłowego uda oraz dwugłowego uda po wysiłku fizycznym i suplementacji kompleksem lipidowym.

Tabela 6:

Zróżnicowanie napięcia mięśniowego mięśni czworogłowego uda oraz dwugłowego uda po wysiłku fizycznym i suplementacji kompleksem lipidowym.

Tabela 1.

L. P.	Suplementacja	Energia [kcal]	B [%]	T[%]	W[%]	Wit. C [mg]	Wit. A [µg]	Wit. E [mg]	Wit. D [µg]	Wit. B6 [mg]	Wit. B12 [µg]	Cholesterol [mg]	KT NAS [g]	KTJNN [g]	KTWN [g]
1	Mg 300 mg	2430,68	19,74	39,95	40,31	91,95	1668,73	15,11	16,09	3,53	3,36	351,18	48,83	38,43	14,86
2	Multivit	2658,29	24,32	37,21	38,47	171,67	2043,14	12,84	8,38	2,74	4,13	334,53	54,30	33,44	15,50
3	Brak	2221,57	26,25	32,99	40,76	45,16	1556,02	7,11	22,92	1,96	9,71	1099,4	36,78	28,26	9,28
4	Brak	1983,61	12,55	12,55	59,53	196,05	1305,26	11,35	1,65	2,91	2,67	359,98	22,08	26,29	9,16
5	Brak	2174,55	20,64	33,02	46,34	236,12	893,89	6,02	6,02	2,36	2,49	592,36	39,08	26,34	8,75
6	Brak	2070,28	23,09	31,14	45,77	101,25	1256,27	8,43	2,20	2,09	2,57	313,98	31,89	23,82	11,72
7	Brak	2097,20	32,91	21,37	45,72	193,61	2338,67	15,11	11,12	5,72	9,15	306,78	20,96	13,64	9,54
8	Multivit	1865,98	24,36	39,23	36,41	185,51	2184,35	10,73	17,85	12,30	3,80	676,56	31,85	32,67	11,16
9	Multivit	2379,42	23,30	30,26	46,44	46,44	357,77	4,05	1,82	1,82	4,68	316,48	36,41	30,82	7,73
10	Mg 200 mg	2070,00	23,98	31,29	44,73	628,43	3402,24	19,23	2,81	3,19	5,79	640,01	38,00	23,10	6,24
11	Mvit. Forte	2147,77	18,82	45,10	36,08	82,08	782,46	7,22	1,86	1,51	3,73	262,86	55,20	40,45	7,06
12	Mvit. Forte	2016,66	16,13	22,82	61,05	133,91	984,50	13,86	14,62	3,77	0,91	223,23	18,64	16,43	12,50
13	Brak	2229,68	25,20	19,31	55,49	23,69	390,68	3,95	0,35	1,83	4,14	256,40	24,10	13,81	6,29
14	Brak	2043,62	25,34	27,78	46,88	134,98	855,46	14,49	15,12	12,24	6,86	403,80	21,65	24,06	13,42
15	Brak	2242,88	22,80	21,09	56,11	108,85	1440,38	9,71	0,41	3,61	2,94	290,45	27,37	14,00	7,15
16	Multivit	2110,84	19,75	40,03	40,22	69,36	3706,05	9,76	18,71	4,02	10,62	1366,2	37,51	41,06	8,27
17	Brak	1704,30	42,47	40,12	17,41	1047,3	2160,38	4,19	17,16	2,24	24,35	336,75	41,56	20,80	8,55
18	Mvit. Forte	2482,11	17,47	51,07	31,46	135,67	2661,16	19,09	18,42	3,40	4,60	466,48	72,91	50,30	11,41
19	Multivit	2195,69	22,85	29,80	47,35	249,37	1529,33	12,47	0,62	3,21	3,70	263,84	30,90	31,21	7,86
20	Multivit	2723,30	24,98	36,12	38,90	157,86	1552,73	16,57	19,11	4,13	7,53	1498,9	36,37	43,91	19,38
21	Wit.C 1000mg	2827,84	16,80	27,53	55,67	133,37	3132,54	8,21	1,37	3,15	4,31	286,37	48,01	27,32	7,28
22	Body Max	2099,47	28,50	30,53	40,97	277,47	3926,52	16,45	16,96	4,93	5,55	930,62	30,78	27,33	7,42
23	Brak	2948,25	27,37	27,21	45,42	268,83	2179,56	6,65	6,14	2,84	9,32	1140,7	38,73	34,78	8,74
24	Brak	3115,90	16,11	38,57	45,32	222,76	2908,20	15,56	5,12	2,46	104,08	630,29	44,02	61,22	18,51

Tabela 2.

Zmienna	Badanie	Pomiar	Grupa Me (QD)		r
			Placebo (n=11))	Suplement (n=12)	
SOD (U/gHb)	1	spocz.	1293.1 (154.8)	1305.2 (207.5)	0.08
		bez. po wys.	1358.8 (45.8)	1371.6 (107.9)	0.22
		1h po wys.	1268.2 (101.3)	1288.5 (123.4)	0.28
		24h po wys.	1293.6 (136.1)	1504.0 (220.7)*	0.42
	2	spocz.	1194.3 (377.9)	1383.9 (259.7)	0.36
		bez. po wys.	1497.9 (275.5)	1720.8 (312.0) #	0.18
		1h po wys.	1573.1 (158.5) #	1617.5 (175.4) #	0.26
		24h po wys.	1585.6 (227.1)	1625.5 (185.3)	0.26
GPx (U/gHb)	1	spocz.	52.0 (5.6)	51.4 (5.2)	0.05
		bez. po wys.	51.5 (2.2)	49.8 (6.9)	0.03
		1h po wys.	52.8 (9.5)	56.2 (10.6)	0.13
		24h po wys.	48.0 (7.8)	51.0 (9.6)	0.26
	2	spocz.	64.0 (3.6)	50.8 (5.2)	0.40
		bez. po wys.	61.6 (4.7)	55.4 (4.5)	0.32
		1h po wys.	63.4 (10.1)	60.8 (9.6)	0.18
		24h po wys.	49.2 (9.1)	56.1 (6.1)	0.15
CAT (U/gHb)	1	spocz.	204.1 (14.9)	199.2 (26.6)	0.01
		bez. po wys.	198.5 (29.0)	196.7 (23.1)	0.06
		1h po wys.	210.9 (23.6)	204.5 (39.7)	0.04
		24h po wys.	189.4 (43.1)	191.5 (23.6)	0.18
	2	spocz.	201.0 (23.1)	195.0 (11.7) #	0.15
		bez. po wys.	191.3 (15.8)	182.3 (34.9)	0.19
		1h po wys.	190.9 (28.6)	209.7 (22.3) ^^*	0.14
		24h po wys.	174.6 (11.0) ##	198.4 (8.7) §	0.36
GSH (µg/mgHb)	1	spocz.	2.6 (0.1)	2.7 (0.2)	0.06
		bez. po wys.	2.5 (0.2)	2.6 (0.2)	0.01
		1h po wys.	2.6 (0.1)	2.6 (0.1)	0.05
		24h po wys.	2.9 (0.2) **§	2.7 (0.2)	0.26
	2	spocz.	2.6 (0.2)	2.5 (0.3) #	0.03
		bez. po wys.	2.6 (0.2)	2.5 (0.2)	0.15
		1h po wys.	2.5 (0.2)	2.5 (0.2)	0.17
		24h po wys.	2.6 (0.2) ##	2.4 (0.2) #	0.10
MDA (µmol/l)	1	spocz.	5.6 (0.8)	4.5 (0.4)**	0.39
		bez. po wys.	5.2 (0.9)	4.9 (0.8)	0.00
		1h po wys.	5.1 (0.9)	4.8 (0.4)	0.17
		24h po wys.	4.8 (0.7)	4.4 (0.8)	0.01
	2	spocz.	6.2 (0.9) ##	5.0 (0.7)**	0.54
		bez. po wys.	7.1 (1.7) ###	5.2 (0.6)**	0.51
		1h po wys.	5.5 (1.5) #	5.8 (0.5) #^	0.05
		24h po wys.	6.2 (1.6) #	5.5 (0.4)	0.31

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ – istotność różnic względem analogicznych wartości otrzymanych w grupie PL

$p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ – istotność różnic względem analogicznych wartości otrzymanych w badaniu 1

^ $p < 0.05$, ^^ $p < 0.01$, ^^ $p < 0.001$ – istotność różnic względem wartości spoczynkowych

** $p < 0.01$ – istotność różnic względem wartości zarejestrowanych bezpośrednio po wysiłku

§ $p < 0.05$ – istotność różnic względem wartości zarejestrowanych 1 h po wysiłku

Tabela 3.

Zmienna	Badanie	Pomiar	Grupa Me (QD)		r
			Placebo (n=11)	Suplement (n=12)	
CK (U/l)	1	spocz.	209.6 (95.8)	220.2 (64.8)	0.06
		bez. po wys.	246.6 (129.5)	277.3 (71.0)	0.05
		1h po wys.	245.1 (121.4)	233.6 (86.5)	0.11
		24h po wys.	410.1 (112) ^{^^^s}	200.3 (53.6) ^{***}	0.63
	2	spocz.	219.9 (117.4)	215.1 (108.2)	0.10
		bez. po wys.	296.6 (140.6)	263.2 (89.0) ^{^^}	0.06
		1h po wys.	232.2 (132.2)	230.6 (84.2) ^{^^}	0.13
		24h po wys.	293.5 (84.0) ^{##}	204.2 (73.5)	0.30
LDH (U/l)	1	spocz.	329.2 (21.6)	343.9 (93.1)	0.00
		bez. po wys.	388.6 (39.7) ^{^^}	409.7 (131.1) ^{^^}	0.08
		1h po wys.	350.8 (27.0)	326.2 (97.8)	0.11
		24h po wys.	329.2 (31.1) ^{***}	332.9 (75.2)	0.03
	2	spocz.	340.0 (29.7)	363.6 (67.4)	0.19
		bez. po wys.	383.4 (45.0) ^{^^}	400.4 (72.0) ^{^^}	0.10
		1h po wys.	358.9 (47.2) [^]	400.0 (65.5)	0.04
		24h po wys.	329.2 (38.4) ^{***s}	370.0 (56.6) ^{**}	0.10
TnT (μg/l)	1	spocz.	7.9 (1.9)	5.4 (1.8)	0.33
		bez. po wys.	12.8 (6.3)	10.9 (3.8) ^{^^}	0.12
		1h po wys.	4.0 (3.3)	8.3 (3.1) [*]	0.44
		24h po wys.	3.4 (1.5) ^{^^***}	6.0 (1.7) ^{***}	0.51
	2	spocz.	4.3 (4.3)	6.6 (1.9)	0.15
		bez. po wys.	5.7 (3.1) [#]	8.9 (2.7) ^{*^^}	0.45
		1h po wys.	4.6 (1.6)	5.9 (3.6) ^{**}	0.19
		24h po wys.	3.2 (0.6)	5.0 (2.0) ^{***}	0.44
Mb (ng/ml)	1	spocz.	45.6 (6.5)	32.2 (12.3) [*]	0.41
		bez. po wys.	80.4 (14.5) [^]	95.0 (38.6)	0.16
		1h po wys.	75.4 (62.4) ^{^^}	59.6 (35.2)	0.13
		24h po wys.	99.8 (22.8) ^{^^}	60.5 (14.0) ^{***}	0.59
	2	spocz.	46.5 (8.9)	26.4 (6.0) ^{**}	0.58
		bez. po wys.	75.2 (25.3)	48.6 (28.2) ^{#^}	0.27
		1h po wys.	80.7 (37.8) [^]	43.8 (14.0) ^{*^}	0.41
		24h po wys.	92.3 (38.9) ^{^^}	28.8 (7.2) ^{***##}	0.67

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ – istotność różnic względem analogicznych wartości otrzymanych w grupie PL

$p < 0.05$, ## $p < 0.01$ – istotność różnic względem analogicznych wartości otrzymanych w badaniu I

^ $p < 0.05$, ^^ $p < 0.01$, ^^ $p < 0.001$ – istotność różnic względem wartości spoczynkowych

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ – istotność różnic względem wartości zarejestrowanych bezpośrednio po wysiłku

s $p < 0.05$, ss $p < 0.01$ – istotność różnic względem wartości zarejestrowanych 1 h po wysiłku

Tabela 4.

Zmienna	Badanie	Pomiar	Grupa Me (QD)		r
			Placebo (n=11)	Suplement (n=12)	
TNF- α (pg/ml)	1	spocz.	12.3 (2.6)	14.0 (4.9)	0.23
		bez. po wys.	21.9 (11.3)	24.3 (18.8) ^{^^}	0.21
		1h po wys.	17.1 (12.8)	20.3 (13.6) [^]	0.21
		24h po wys.	15.0 (4.1)	12.5 (2.4) ^{***\$}	0.24
	2	spocz.	14.0 (2.2)	11.3 (4.6)	0.17
		bez. po wys.	23.3 (2.5) [^]	23.5 (7.8) ^{^^}	0.12
		1h po wys.	16.6 (9.0)	22.2 (9.9) ^{^^}	0.00
		24h po wys.	11.2 (5.0) ^{***\$}	15.7 (7.1) ^{\$}	0.12
hsIL-6 (pg/ml)	1	spocz.	1.2 (0.2)	1.0 (0.3)	0.15
		bez. po wys.	2.1 (0.7) ^{^^}	1.7 (0.7) [^]	0.33
		1h po wys.	2.7 (0.9) ^{^^}	2.1 (0.6) ^{*^^}	0.47
		24h po wys.	1.7 (0.3)	1.3 (0.7)	0.22
	2	spocz.	1.8 (1.5) [#]	1.0 (0.5)	0.33
		bez. po wys.	2.2 (2.1) [^]	1.3 (0.5)	0.41
		1h po wys.	2.4 (1.7) ^{^^}	1.5 (0.6) ^{^^}	0.40
		24h po wys.	2.1 (1.4)	1.4 (0.6)	0.30

* $p < 0.05$ – istotność różnic względem analogicznych wartości otrzymanych w grupie PL

$p < 0.05$ – istotność różnic względem analogicznych wartości otrzymanych w badaniu 1

[^] $p < 0.05$, ^{^^} $p < 0.01$, ^{^^^} $p < 0.001$ – istotność różnic względem wartości spoczynkowych

^{***} $p < 0.001$ – istotność różnic względem wartości zarejestrowanych bezpośrednio po wysiłku

^{\$} $p < 0.05$ – istotność różnic względem wartości zarejestrowanych 1 h po wysiłku

Tabela 5.

Zmienna	Badanie	Pomiar	Grupa Me (QD)		r
			Placebo (n=11))	Suplement (n=12)	
PT4R (kG)	1	spocz.	89.0 (18.5)	70.0 (19.7)	0.33
		bez. po wys.	75.0 (24.0) ^	53.5 (20.2) *^^	0.48
		1h po wys.	77.0 (24.5)	54.0 (16.4) *^	0.42
		24h po wys.	66.0 (21.0) ^^\$\$	51.0 (18.0) ^^	0.25
	2	spocz.	102.0 (21.5) #	70.4 (15.8) *#	0.45
		bez. po wys.	89.9 (20.9) ^^	59.9 (12.7) ^^	0.36
		1h po wys.	100.0 (22.3) ###*	63.7 (19.1) *###	0.41
		24h po wys.	90.0 (21.6) ###^\$	73.0 (16.1) ###	0.24
PT4L (kG)	1	spocz.	90.0 (17.5)	74.0 (18.8)	0.37
		bez. po wys.	76.0 (24.0) ^^	52.5 (19.9) *^^	0.45
		1h po wys.	78.0 (25.0)	55.5 (15.3)	0.37
		24h po wys.	67.0 (21.0) ^^\$\$	47.0 (19.0) ^^\$\$\$	0.35
	2	spocz.	102.0 (19.6)	73.0 (16.8) *#	0.42
		bez. po wys.	88.0 (18.2) ^^	56.4 (11.0) ^^	0.36
		1h po wys.	99.0 (23.6) #**	65.7 (15.2) ###*	0.24
		24h po wys.	94.0 (19.2) ###^^	75.4 (14.2) ###^	0.39
PT2R (kG)	1	spocz.	91.0 (13.0)	67.0 (18.0) *	0.45
		bez. po wys.	76.0 (26.0) ^^	58.0 (20.8) ^^	0.35
		1h po wys.	79.0 (22.5)	60.5 (17.0)	0.32
		24h po wys.	72.0 (18.5) ^^\$\$	53.5 (16.4) ^^\$\$\$	0.35
	2	spocz.	99.6 (14.7)	80.0 (17.4) ###	0.19
		bez. po wys.	87.0 (26.9) ^^	66.6 (16.1) ^^	0.23
		1h po wys.	101.0 (22.0)	73.3 (14.5) ###	0.17
		24h po wys.	100.0 (12.2) #####	72.2 (14.0) *#####	0.49
PT2L (kG)	1	spocz.	92.0 (14.0)	69.5 (17.3) *	0.47
		bez. po wys.	76.0 (23.0) ^^	58.5 (17.4) ^^	0.32
		1h po wys.	79.0 (22.5)	60.5 (21.0) ^	0.33
		24h po wys.	69.0 (18.0) ^^\$\$	54.5 (18.4) ^^	0.28
	2	spocz.	97.2 (15.3)	80.6 (16.3) ###	0.19
		bez. po wys.	78.0 (20.6) ^^	67.0 (12.9) *^^	0.01
		1h po wys.	101.0 (24.4) *	76.9 (19.0) ###	0.06
		24h po wys.	97.0 (9.6) ###**	79.1 (14.3) ####	0.24

* $p < 0.05$ – istotność różnic względem analogicznych wartości otrzymanych w grupie PL

$p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ – istotność różnic względem analogicznych wartości otrzymanych w badaniu 1

^ $p < 0.05$, ^^ $p < 0.01$, ^^ ^ $p < 0.001$ – istotność różnic względem wartości spoczynkowych

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ – istotność różnic względem wartości zarejestrowanych bezpośrednio po wysiłku

^ $p < 0.05$, ^^ $p < 0.01$, \$\$\$ $p < 0.001$ – istotność różnic względem wartości zarejestrowanych 1 h po wysiłku

Tabela 6.

Zmienna	Badanie	Pomiar	Grupa Me (QD)		r
			Placebo (n=11))	Suplement (n=12)	
AUC4R	1	spocz.	17.0 (2.4)	15.1 (0.5) *	0.44
		bez. po wys.	14.5 (2.2) ^^	12.0 (0.7) **^^	0.53
		1h po wys.	16.9 (2.6) •	12.7 (0.8) **	0.56
		24h po wys.	17.0 (3.9)	10.5 (0.5) **^^\$	0.55
	2	spocz.	14.3 (1.1) #	16.5 (1.5) **#	0.54
		bez. po wys.	11.2 (1.2) ^	16.4 (2.2) ***###	0.64
		1h po wys.	11.9 (1.6)	15.6 (4.4)	0.09
		24h po wys.	10.2 (1.5) #^^	15.0 (6.1)	0.03
AUC4L	1	spocz.	15.6 (0.8)	14.8 (0.6) **	0.57
		bez. po wys.	13.8 (1.7) ^^	12.4 (0.9) *^^	0.49
		1h po wys.	16.2 (2.2) •	12.8 (0.9) ***	0.61
		24h po wys.	16.7 (3.6)	10.5 (1.0) **^^\$	0.55
	2	spocz.	13.7 (1.8)	16.5 (0.6) **###	0.51
		bez. po wys.	11.2 (1.2) ^^	16.0 (2.7) **###	0.54
		1h po wys.	12.1 (1.5) #	15.4 (4.8)	0.08
		24h po wys.	9.7 (1.8) #^^	14.8 (6.5)	0.04
AUC2R	1	spocz.	15.4 (1.1)	13.5 (0.7) ***	0.62
		bez. po wys.	12.9 (1.7) ^	10.6 (0.6) **^	0.56
		1h po wys.	14.8 (2.8)	10.4 (0.9) ***^	0.61
		24h po wys.	15.3 (3.3)	9.7 (0.9) ***^^•	0.59
	2	spocz.	12.3 (1.4) ###	16.8 (1.8) ***###	0.67
		bez. po wys.	10.3 (1.2) ^	15.9 (3.3) ***###	0.60
		1h po wys.	10.9 (1.1)	15.3 (5.2)	0.10
		24h po wys.	9.9 (1.0) ^^	14.7 (7.0)	0.04
AUC2L	1	spocz.	14.8 (0.7)	13.5 (0.7) ***	0.60
		bez. po wys.	12.1 (1.5) ^	10.6 (0.5) ^	0.48
		1h po wys.	14.8 (2.5)	10.6 (1.0) ***^	0.62
		24h po wys.	15.3 (3.3)	9.6 (0.6) ***^^	0.62
	2	spocz.	12.8 (1.3) #	16.7 (1.8) ***###	0.69
		bez. po wys.	9.9 (1.0) #^^	15.7 (3.9) ###	0.50
		1h po wys.	10.7 (0.8) #	15.1 (5.7)	0.09
		24h po wys.	9.2 (1.2) ^^	14.5 (7.4)	0.05

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ – istotność różnic względem analogicznych wartości otrzymanych w grupie PL

$p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ – istotność różnic względem analogicznych wartości otrzymanych w badaniu 1

^ $p < 0.05$, ^^ $p < 0.01$, ^^ $p < 0.001$ – istotność różnic względem wartości spoczynkowych

• $p < 0.05$ – istotność różnic względem wartości zarejestrowanych bezpośrednio po wysiłku

\$ $p < 0.05$ – istotność różnic względem wartości zarejestrowanych 1 h po wysiłku

