Medical Journal
of
Tabriz University of Medical Sciences

Original Article

The effect of cold-water immersion after eccentric exercise on oxidative and inflammatory responses in skeletal muscle

Tohid Hemmatzadeh Beddovli[1], Maryam Nourshahi[1]*, Rana Fayyaz Milani[1], Siavash Parvardeh[2]

[1]Department of Biological Sciences in Sport and Health, Faculty of Sports Sciences and Health, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
[2]Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
*Corresponding author; E-mail: m-nourshahi@sbu.ac.ir

Received: 2 Nov 2019 Accepted: 4 Jan 2020 First Published online: 23 May 2021
Med J Tabriz Uni Med Sciences. 2021;43(2):230-239

Abstract

Background: Oxidative stress and inflammation increase after eccentric exercise. Cold-water immersion after exercise is common among athletes to accelerate recovery. Therefore, the purpose of this study was to investigate the effect of cold-water immersion after eccentric exercise on the oxidative and inflammatory responses in skeletal muscle.

Methods: One hundred male Wistar rats (weight 285.11 ± 41.65) were randomly divided into control, eccentric exercise, eccentric exercise + normal water, and eccentric exercise + cold water groups. Half, 24, 48, 72, and 168 hours after eccentric exercise, EDL muscle was removed in sterile conditions. The eccentric exercise involves 90 minutes of interval running on the treadmill at a speed of 16 m/min and a -16-degree slope. Muscle reactive oxygen species (ROS) and tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) levels were measured by DCFDA and immunohistochemical staining. Kolmogorov-Smirnov for normality test and repeated measure ANOVA and Tukey's post-Hoc tests for compare groups were used with a significance level of $P \leq 0.05$.

Results: After eccentric exercise, ROS and TNF-α levels significantly ($P<0.05$) increased in the three experimental groups. The peak of ROS increase in the eccentric exercise, eccentric exercise + normal water, and eccentric exercise + cold water groups were recorded significantly ($P<0.001$) half, 48, and 72 hours after eccentric exercise, respectively. Also, the peak of TNF-α increase was significantly higher in the eccentric exercise and eccentric exercise + normal water groups were at 48 hours and in the eccentric exercise + cold water groups was at 72 hours after eccentric exercise ($P<0.001$).

Conclusion: Immersion in cold water causes an increase and delays the peak of ROS and TNF-α after eccentric exercise, which is probably related to ischemia-reperfusion injury. Therefore, after unaccustomed, eccentric, and damaging exercise, immersion in cold water is not recommended.

Keywords: Cold-water immersion, Eccentric exercise, Ischemia-reperfusion, ROS, TNF-α

How to cite this article: Hemmatzadeh Beddovli T, Nourshahi M, Fayyaz Milani R, Parvardeh S. [The effect of cold-water immersion after eccentric exercise on oxidative and inflammatory responses in skeletal muscle]. Med J Tabriz Uni Med Sciences. 2021;43(2):230-239. Persian.

© 2021 The Author. This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

مقاله پژوهشی

اثر غوطه‌وری در آب سرد بعد از فعالیت برونگرا بر پاسخ‌های اکسیداتیو و التهابی در عضله اسکلتی

توحید همت‌زاده بدولی[۱]، مریم نورشاهی[۱*]، رعنا فیاض میلانی[۱]، سیاوش پرورده[۲]

[۱]گروه علوم زیستی ورزش، دانشکده علوم ورزشی و تندرستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
[۲]گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
نویسنده مسؤول؛ ایمیل: m-nourshahi@sbu.ac.ir

دریافت: ۱۳۹۸/۸/۱۱ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۰/۱۴ انتشار برخط: ۱۴۰۰/۳/۲
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز. ۱۴۰۰؛ ۴۳(۲):۲۳۰-۲۳۹

چکیده

زمینه: بعد از فعالیت ورزشی برونگرا، فشار اکسیداتیو و التهاب افزایش می‌یابد. غوطه‌وری در آب سرد بعد از فعالیت ورزشی جهت تسریع ریکاوری بین ورزشکاران مرسوم است. بنابراین، هدف از تحقیق حاضر بررسی اثر غوطه‌وری در آب سرد بعد از فعالیت برونگرا بر پاسخ‌های اکسیداتیو و التهابی در عضله اسکلتی می‌باشد.

روش‌کار: یک‌صد سر موش نر ویستار (وزن ۴۱/۶۵±۲۸۵/۱۱) به‌طور تصادفی به گروه‌های کنترل، فعالیت برونگرا، فعالیت برونگرا + آب معمولی و فعالیت برونگرا + آب سرد تقسیم شدند. نیم، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۱۶۸ ساعت بعد از فعالیت برونگرا، عضله EDL در شرایط استریل شده خارج شد. فعالیت برونگرا شامل ۹۰ دقیقه دویدن متناوب روی تریدمیل با سرعت ۱۶ متر در دقیقه و با شیب ۱۶- می‌باشد. مقدار گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن (ROS) و عامل نکروز توموری-آلفا (TNF-α) عضلانی با روش‌های آزمایشگاهی DCFDA و رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی اندازه‌گیری شدند. از آزمون‌های آماری کلموگروف- اسمیرنوف برای نرمال بودن داده‌ها و آزمون آنالیز واریانس دوسویه با اندازه‌گیری مکرر و آزمون تعقیبی توکی برای مقایسه بین گروه‌ها با سطح معناداری $p\leq ۰/۰۵$ استفاده گردید.

یافته‌ها: بعد از فعالیت برونگرا ROS و TNF-α در سه گروه تجربی نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری داشت ($p<۰/۰۵$). اوج افزایش ROS به‌طور معنادار در گروه‌های فعالیت برونگرا، فعالیت برونگرا + آب معمولی و فعالیت برونگرا + آب سرد به ترتیب نیم، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از فعالیت برونگرا بود ($p<۰/۰۰۱$). همچنین، اوج افزایش TNF-α به طور معناداری در گروه‌های فعالیت برونگرا و فعالیت برونگرا + آب معمولی ۴۸ ساعت و در گروه فعالیت برونگرا + آب سرد ۷۲ ساعت بعد از فعالیت برونگرا بود ($p<۰/۰۰۱$).

نتیجه‌گیری: غوطه‌وری در آب سرد باعث افزایش بیشتر و به تأخیر افتادن اوج افزایش ROS و TNF-α بعد از فعالیت برونگرا می‌شود که احتمالاً به آسیب ناشی از ایسکمی- ریپرفیوژن ارتباط دارد. بنابراین، بعد از فعالیت ورزش شدید، غیر متعارف، برونگرا و آسیب‌زا، غوطه‌وری در آب سرد پیشنهاد نمی‌شود.

کلید واژه‌ها: غوطه‌وری در آب سرد، فعالیت برونگرا، ROS، TNF-α و ایسکمی- ریپرفیوژن

نحوه استناد به این مقاله: همت‌زاده بدولی ت، نورشاهی م، فیاض میلانی ر، سیاوش پرورده س. اثر غوطه‌وری در آب سرد بعد از فعالیت برونگرا بر پاسخ‌های اکسیداتیو و التهابی در عضله اسکلتی. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز. ۱۴۰۰؛ ۴۳(۲):۲۳۰-۲۳۹

حق تالیف برای مولفان محفوظ است.
این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی تبریز تحت مجوز کریتیو کامنز (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر گردیده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد

مقدمه

ریکاوری از فعالیت ورزشی فرآیندی است که به وسیله آن بدن به شرایط قبل از فعالیت ورزشی برمی‌گردد. اگر چه ریکاوری از فعالیت ورزشی به‌طور طبیعی با گذشت زمان اتفاق می‌افتد، ولی ورزشکاران و مربیان علاقمندند این فرآیند را تسریع کنند تا زمان بین جلسات تمرین را کاهش دهند (۱). بعد از فعالیت ورزشی چندین روش تسریع کننده ریکاوری وجود دارد که شامل لیزردرمانی، ماساژ، کانتراست (غوطه‌وری در آب گرم و سرد) و غوطه‌وری در آب سرد می‌باشد. غوطه‌وری در آب سرد به دلیل هزینه کم و آسان بودن بین ورزشکاران مرسوم می‌باشد (۲).

فعالیت ورزشی که تجربه تازه، انقباض برونگرا و شدت یا مدت زیاد داشته باشد فشار غیرمتعارفی را بر بدن وارد می‌کند (۳). بسته به ماهیت فعالیت ورزشی، فشار فعالیت ممکن است به‌طور غالب مکانیکی، متابولیک یا ترکیبی از این دو باشد (۴). فعالیت ورزشی (برای مثال فعالیت‌های استقامتی و اینتروال) ابتدا فشار متابولیک در عضله فعال ایجاد می‌کند که منجر به تولید گونه‌های واکنشی اکسیژن (ROS) می‌شود. ROS خیلی فعال بوده و ساختارهای پروتئینی و لیپیدی را تخریب می‌کند (۳). فشار مکانیکی حین فعالیت‌های ورزشی که انقباض‌هایی با حداکثر نیرو دارند (برای مثال فعالیت‌های پلایومتریک و مقاومتی) بر عضله اسکلتی تحمیل شده و منجر به تخریب فیزیکی مستقیم سارکولما، سارکومرها، سیستم جفت شدن تحریک- انقباض و بافت همبند عضله اسکلتی می‌شود. به‌طور شاخص، فعالیت‌های برونگرا شدت زیادی از فشار مکانیکی را بر عضله اسکلتی اعمال می‌کنند و متعاقب آن آسیب عضلانی بیشتری را در مقایسه با انقباض‌های درونگرا و ایزومتریک ایجاد می‌کنند (۳).

فعالیت برونگرا منجر به افزایش فشار اکسیداتیو، ROS و التهاب شده و عملکرد را کاهش می‌دهد. افزایش کم تا متوسط ROS اثرات مثبتی بر سیستم ایمنی و عملکرد متابولیک دارد ولی افزایش بیش از حد آن می‌تواند مضر باشد (۵). ROS مسیر سیگنالینگ NF-ƙB را فعال و تولید سایتوکاین‌های پیش‌التهابی را افزایش می‌دهد (۶). سایتوکاین‌های پیش التهاب نقش مهمی در تخریب عضلانی دارند و TNF-α به عنوان سایتوکاین کلیدی، تجزیه پروتئین‌های عضلانی و پاسخ‌های ایمنی را افزایش می‌دهد (۷). بروش و همکاران در یک مقاله مروری نشان دادند که غوطه‌وری در آب سرد اثر مثبتی بر تمرینات و فعالیت‌های استقامتی و اثرات منفی بر تمرینات و فعالیت‌های مقاومتی دارد (۵). فورتادو و همکاران (۸) نشان دادند که از غوطه‌وری در آب سرد بلافاصله بعد از یک جلسه فعالیت شنا تا حد خستگی، فعالیت ضدالتهابی را افزایش و تولید ROS را کاهش می‌دهد.

نکات کاربردی

۱. بعد از فعالیت‌های غیرمتعارف، شدید، برونگرا و آسیب‌زا پاسخ‌های اکسیداتیو و التهابی به طور موقت افزایش یافته و سپس کاهش می‌یابد به طوری که بعد از یک هفته به مقدار پایه می‌رسند.

۲. غوطه‌وری در آب سرد بعد از فعالیت برونگرا، پاسخ‌های اکسیداتیو و التهابی را بیشتر افزایش می‌دهد. بنابراین، برای ورزشکاران توصیه می‌شود که بعد از فعالیت‌های غیرمتعارف، شدید و برونگرا از غوطه‌وری در آب سرد ۱۰ درجه خودداری کنند.

فنگ‌او و همکاران (۹) در مقاله مروری نشان دادند که فعالیت غیرمتعارف و تا حد خستگی، منجر به تولید ROS، آسیب‌های ناشی از تولید ROS و مختل شدن انقباض عضلانی می‌شود.

ROS در هر دوی فعالیت‌های هوازی و بی‌هوازی و از طریق میتوکندری‌ها، NADPH اکسیداز و گزانتین اکسیداز تولید می‌شود (۹). ریتاموزو و همکاران (۱۰) در تحقیقی مشابه تحقیق حاضر نشان دادند که فعالیت گزانتین اکسیداز (یکی از فاکتورهای درگیر در تولید ROS) بعد از یک جلسه فعالیت برونگرا تا ۱۲ ساعت افزایش می‌یابد. همچنین، قون زو و همکاران (۱۱) نیز در تحقیقی مشابه تحقیق حاضر نشان دادند که یک جلسه فعالیت برونگرا TNF-α و اینترلوکین-۶ را افزایش داد و این افزایش تا دو هفته بعد از فعالیت هم در عضله Soleus وجود داشت.

با توجه به این‌که فعالیت ورزشی آسیب‌زا، بویژه فعالیت‌های برونگرا، باعث افزایش پاسخ‌های اکسیداتیو و التهابی می‌شود و این پاسخ‌ها به هم‌وابسته‌اند، به طوری که، افزایش ROS می‌تواند TNF-α را افزایش دهد، پس غوطه‌وری در آب سرد بعد از فعالیت ورزشی نیز با توجه به نوع فعالیت ورزشی اثرات متفاوتی بر بدن می‌گذارد. هم‌چنین، تحقیقی یافت نشد که اثر غوطه‌وری در آب سرد بر پاسخ‌های التهابی و اکسیداتیو را در زمان‌های مختلف ریکاوری بعد از فعالیت برونگرا نشان دهد. بنابراین، هدف از تحقیق حاضر بررسی اثر غوطه‌وری در آب سرد بعد از فعالیت برونگرا بر پاسخ‌های اکسیداتیو و التهابی می‌باشد.

روش‌کار

نوع مطالعه:

این پژوهش از نوع بنیادی- توسعه‌ای می‌باشد که به روش تجربی انجام گرفته است.

حجم نمونه:

با استفاده از نرم‌افزار Gpower در سطح خطای نوع اول ۰/۰۵، توان ۰/۷۶ و اندازه اثر ۰/۲۵ حجم نمونه برای آزمون آماری آنالیز واریانس دوسویه با اندازه‌گیری‌های تکراری برابر ۱۰۰ بدست آمد.

آزمودنی‌ها:

تعداد ۱۰۰ سر موش صحرائی (۴۱/۶۵±۲۸۵/۱۱ گرم) نر نژاد ویستار که هیچ نوع تحقیقی روی آن‌ها انجام نشده است از مرکز سرم‌سازی رازی خریداری شد. موش‌ها در دمای اتاق (۲۲ درجه سانتی‌گراد) و چرخه معکوس ۱۲ ساعت خواب و بیداری و با در دسترس بودن آب و غذا، نگهداری و کنترل شدند. تحقیق حاضر با کد اخلاق IR.SSRC.1398.065، مورد تأیید کمیته سازمانی اخلاق در پژوهش‌های زیست پزشکی پژوهشگاه تربیت بدنی می‌باشد.

حیوانات به مدت یک هفته برای سازگار شدن با محیط آزمایشگاه در قفس‌های ۴ تایی با دادن غذا و آب کافی در محیط آزمایشگاه قرار گرفتند. حیوانات یک هفته برای آشنا سازی با تریدمیل و محیط آبی به مدت یک هفته روی تریدمیل با حداکثر سرعت ۱۰ متر در دقیقه و شیب صفر درجه دویدند و سپس حداکثر به مدت ۳ دقیقه در آب معمولی (۲۵ درجه) غوطه‌ور شدند. بعد از دو هفته آشنا سازی با محیط، نوارگردان و آب معمولی (۲۵ درجه) به‌طور تصادفی به ۲۰ گروه، پنج گروه کنترل، پنج گروه فعالیت برونگرا، پنج گروه فعالیت برونگرا + آب معمولی (غوطه‌وری در آب ۲۵ درجه) و پنج گروه فعالیت برونگرا + آب سرد (غوطه‌وری در آب ۱۰ درجه) تقسیم شدند. گروه‌ها به ترتیب نیم ساعت، ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت، ۷۲ ساعت و ۱۶۸ ساعت (یک هفته) بعد از انجام فعالیت برونگرا تشریح شدند. لازم به ذکر است که، برای نشان دادن اثر فعالیت برونگرا، گروه کنترل و گروه فعالیت برونگرا با هم مقایسه شدند، برای نشان دادن اثر فشار هیدرواستاتیک آب، گروه فعالیت برونگرا و گروه فعالیت برونگرا + آب معمولی با هم مقایسه شدند و برای نشان دادن اثر سردی آب نیز گروه فعالیت برونگرا + آب معمولی با گروه فعالیت برونگرا + آب سرد با هم مقایسه شدند.

حیوانات ابتدا از طریق تزریق صفاقی ترکیب Ketamine و Xylazine بی‌هوش و تشریح شدند. عضله بازکننده بلند انگشت شست (EDL) آن‌ها تحت شرایط استریل شده خارج شد. عضله پای راست حیوان در ازت مایع فریز شد و سپس برای انجام مراحل بعدی به یخچال فریزر ۸۰- درجه منتقل شدند. عضلات پای چپ حیوان جهت رنگ‌آمیزی در فرمالین ۷ درصد قرار داده شد.

پروتکل فعالیت برونگرا:

فعالیت برونگرا شامل ۹۰ دقیقه دویدن اینتروال (۱۸ ست فعالیت ۵ دقیقه‌ای با ۲ دقیقه استراحت بین ست‌ها) بر روی نوارگردان با سرعت ۱۶ متر در دقیقه و با شیب ۱۶ درجه منفی می‌باشد (۱۲). همچنین ۵ دقیقه گرم کردن و ۵ دقیقه سرد کردن برای رعایت اصول علم تمرین در ابتدا و انتهای فعالیت اختصاص داده شد.

پروتکل غوطه‌وری در آب:

حیوانات گروه‌های فعالیت برونگرا + آب معمولی و فعالیت برونگرا + آب سرد، بلافاصله بعد از انجام فعالیت برونگرا در آب معمولی ۲۵ درجه سانتی‌گراد و آب سرد ۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه غوطه‌ور شدند. لازم به ذکر است که آب معمولی ۲۵ درجه و ۱۰ درجه سانتی‌گراد برای تفکیک اثر فشار هیدرواستاتیک آب و سردی آب در نظر گرفته شده است.

آماده‌سازی بافت عضله جهت رنگ‌آمیزی

بعد از اینکه بافت‌ها به مدت حدوداً یک هفته در فرمالدهید ۷ درصد نگهداری شد، به منظور آمادگی بافت جهت قالب‌گیری، ابتدا بافت به مدت ۱۵ دقیقه با آب جاری شستشو داده شد و سپس برای انجام مراحل آب گیری (با الکل‌های صعودی)، شفاف‌سازی (با زایلول) و آغشتگی (با پارافین)، نمونه‌ها به ترتیب در فرمالین، الکل ۷۰ درصد، الکل ۸۰ درصد، الکل ۹۶ درصد، الکل مطلق، زایلول (دو بار) و پارافین ۶۰ درجه سانتی‌گراد (دو بار)، در دستگاه پروسسور قرار داده شد. برای قالب‌گیری، نمونه‌ها در قالب قرار داده و پارافین روی آن ریخته شد و بعد از آن نمونه‌های پارافینه و قالب‌گیری شده برای برش‌گیری در یخچال نگهداری شدند. برش‌گیری عرضی با استفاده از دستگاه میکروتوم روتاری با ضخامت ۵ میکرون انجام شد. بافت‌های برش داده شده به حالت شناور در آب تیشوفلوت با دمای ۵۰-۵۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. زمانی که پارافین‌ها کمی از هم باز شدند با کمک لام‌های ژلاتینه شده برداشته شدند. به مدت ۲۴ ساعت در دستگاه فور با دمای ۳۷ درجه قرار داده شد و سپس تا انجام مراحل رنگ‌آمیزی در یخچال نگهداری شد.

ایمونوهیستوشیمی:

برای اندازه‌گیری TNF-α از روش ایمونوهیستوشیمی و با استفاده از آنتی‌بادی مخصوص TNF-α ((۳TN-۱۹,۱۲) HRP (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)) استفاده گردید. برش‌ها ۲ بار در زایلن با فاصله‌های ۵ دقیقه دپارافینه شدند، ۲ بار در اتانول ۱۰۰٪ به مدت ۳ دقیقه، و در اتانول ۹۵٪ و اتانول ۸۰٪ هرکدام به مدت ۱ دقیقه دهیدراته و سپس با آب مقطر شسته شدند. برش‌های بافتی در داخل ظروف پلاستیکی (Goplin jar) پرشده با سیترات بافر ۴,۷ قرار داده شد. ظروف با فیلم سوراخ شده پوشش داده شد تا تبخیر به حداقل برسد و در داخل مایکروویو قرار داده شد و به مدت ۵ دقیقه با قدرت متوسط (w۶۰۰) روشن گردید. مایعات از دست رفته تبخیری با چرخه بافر تازه جایگزین شد (با سه بار تکرار). زمانی که ظرف

رنگ‌آمیزی به دمای مورد نظر رسید اسلایدها برای ۲۰ دقیقه خنک شدند. اسلایدها دو بار به مدت ۵ دقیقه در TBST با تکان‌های ملایم شست و شو داده شد و سپس در TBS حاوی ۱۰٪ سرم نرمال و ۱٪ BSA به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق بلوک شد. اسلایدها به مدت چند ثانیه آب‌کشی شدند و اطراف برش‌های بافتی با دستمال کاغذی خشک گردید. برش‌ها با آنتی‌بادی اولیه رقیق شده در TBS- BSA به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴c° پروب گردید، دو بار به مدت ۵ دقیقه در TBS با تکان‌های ملایم شست و شو داده شد و در H_2O_2-TBS به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد. آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه شده با آنزیم (رقیق شده درTBS- BSA) به اسلایدها اضافه گردید و به مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. کروموژن (DAB) در دمای اتاق به مدت ۱۰ دقیقه اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه با آب معمولی به مدت ۵ دقیقه شست و شو داده شد. در انتها با استفاده از میکروسکوپ الکترونیک با رزولیشن ۵۰، عکسبرداری شدند.

روش رنگ‌آمیزی DCFDA:

برای سنجش ROS از روش آزمایشگاهی DCFDA استفاده گردید. این روش آزمایشی تشخیص H_2O_2 به عنوان محصول نهایی گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) در مایعات بیولوژیک، سلول‌های سوسپانسیونه، همچنین سلول‌های چسبنده و حتی بافتهای زنده مورد استفاده قرار می‌گیرد. این آزمایش با استفاده از معرف نفوذپذیر سلولی ۲و۷–دی کلروفلورسین دی‌استات (DCFDA)، به عنوان یک رنگ فلوروژنیک بوده و هیدروکسیل، پراکسیل و دیگر فعالیت‌های ROS را درون سلول اندازه‌گیری می‌کند. پس از نفوذ به داخل سلول، DCFDA توسط استرازهای سلولی دی استیله شده و به یک ترکیب غیر فلورسنت تبدیل می‌گردد، که بعداً توسط ROS اکسید شده و به ۲و۷– دی کلروفلورسین (DCF) تبدیل می‌گردد. DCF یک ترکیب بسیار فلورسنت است که می‌تواند با طیف سنجی فلورسانس با استفاده از ابزار فلوسیتومتری، فلوریمتری یا میکروسکوپ فلورسنت با حداکثر تحریک ۴۹۵ نانومتر (نور آبی) و طیف انتشار ۵۲۹ نانومتر (نور سبز) تشخیص داده شود.

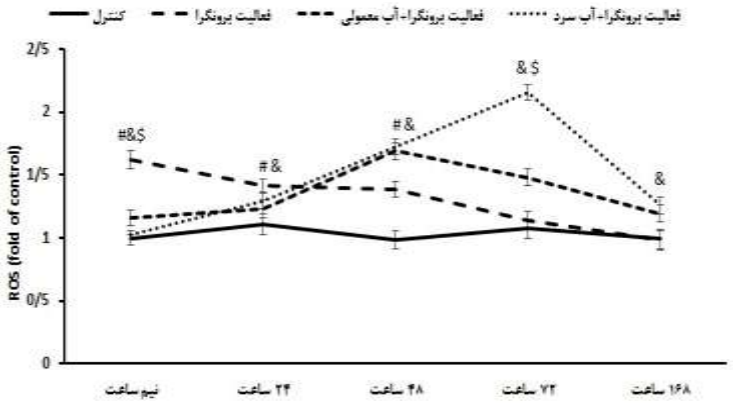
روش آماری:

نتایج آزمـون گولموگروف–اسمیرنف نشان داد که داده‌ها از توزیع طبیعی برخوردار هستند؛ لذا از آمار پارامتریک استفاده شد. هم‌چنین، جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از آمار توصیفی و استنباطی استفاده شد و برای بررسی تغییرات درون‌گروهی و برون‌گروهی متغیرها از آزمون آنالیز واریانس با اندازه‌گیری مکرر و از آزمون تعقیبی توکی جهت مقایسه میانگین‌های بین‌گروهی در سطح معنی‌داری $p\leq ۰/۰۵$ با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۵ استفاده شد.

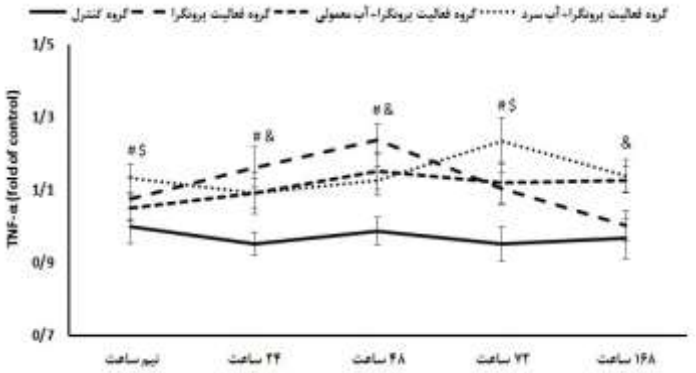
یافته‌ها

آزمون کولموگروف– اسمیرنف نشان داد که تمامی داده‌های ROS و TNF-α توزیع نرمال دارند ($p>۰/۰۵$). نتایج آزمون آنالیز واریانس دوسویه با اندازه‌گیری مکرر نشان داد که فرض برابری میانگین‌های ROS بین پنج زمان مختلف در گروه‌های مختلف رد می‌شود ($F_{(۱۲و۶۴)}=۱۳۹/۳۸۳$، $p<۰/۰۰۱$) (شکل ۱). آزمون تعقیبی توکی نیز نشان داد که فعالیت برونگرا ROS را در زمان‌های نیم، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از فعالیت به‌طور معناداری افزایش داد ($p<۰/۰۰۱$)، ولی در زمان‌های ۷۲ ساعت ($p=۰/۱۱۶$) و ۱۶۸ ساعت ($p=۰/۸۲۳$) بعد از فعالیت، اثر معناداری بر ROS ندارد. فشار هیدرواستاتیک آب در زمان‌های نیم ساعت و ۲۴ ساعت بعد از فعالیت، ROS را به‌طور معناداری کاهش ($p<۰/۰۰۱$) و در زمان‌های ۴۸، ۷۲ و ۱۶۸ ساعت بعد از فعالیت برونگرا، ROS را به طور معناداری افزایش داد ($p<۰/۰۰۱$). سردی آب نیز نیم ساعت بعد از فعالیت به‌طور معناداری ROS را کاهش داد ($p<۰/۰۵$)، ۲۴ ساعت ($p=۰/۱۷۵$)، ۴۸ ساعت ($p=۰/۴۷۷$) و ۱۶۸ ساعت ($p=۰/۱۳۰$) بعد از فعالیت اثری بر ROS نداشت، ولی ۷۲ ساعت بعد از فعالیت باعث افزایش معنادار ROS شد ($p<۰/۰۰۱$).

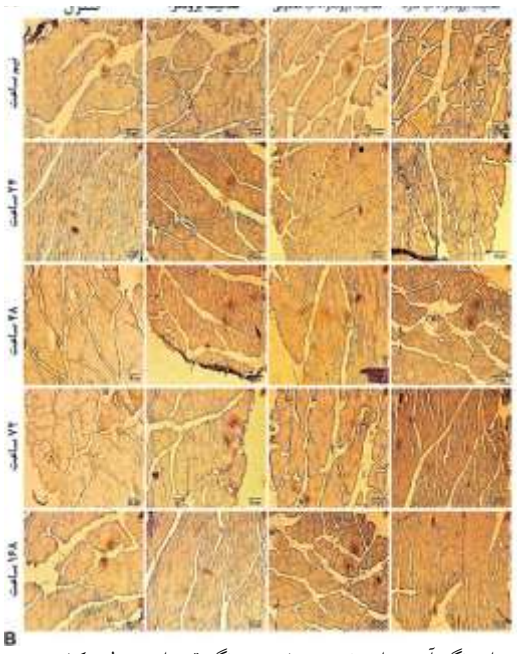
نتایج آزمون آنالیز واریانس دوسویه با اندازه‌گیری مکرر نشان داد که فرض برابری میانگین‌های TNF-α بین پنج زمان مختلف در گروه‌های مختلف رد می‌شود ($F_{(۶/۷۶و۳۶/۰۸)}=۲۶/۰۲۰$، $p<۰/۰۰۱$) (شکل ۲) و (تصویر ۱). نتایج آزمون توکی نیز نشان داد که فعالیت برونگرا نیم ساعت ($p<۰/۰۵$)، ۲۴ ساعت ($p<۰/۰۰۱$)، ۴۸ ساعت ($p<۰/۰۰۱$) و ۷۲ ساعت ($p<۰/۰۱$) بعد از فعالیت، به‌طور معناداری TNF-α را افزایش داد، ولی بعد از ۱۶۸ ساعت، اثر معناداری بر TNF-α نداشت ($p=۰/۷۰۵$). فشار هیدرواستاتیک آب نیم ساعت ($p=۰/۸۵۰$) و ۷۲ ساعت ($p=۰/۵۵۸$) بعد از فعالیت، اثر معناداری بر TNF-α نداشت، ۲۴ ساعت ($p<۰/۰۰۱$) و ۴۸ ساعت ($p<۰/۰۰۱$) بعد از فعالیت TNF-α را کاهش و ۱۶۸ ساعت ($p<۰/۰۱$) بعد، آن را به‌طور معناداری افزایش داد. سردی آب، نیم ساعت ($p<۰/۰۵$) و ۷۲ ساعت ($p<۰/۰۵$) بعد از فعالیت TNF-α را به‌طور معناداری افزایش داد، ولی ۲۴ ساعت ($p=۰/۹۹۸$)، ۴۸ ساعت ($p=۰/۸۱۶$) و ۱۶۸ ساعت ($p=۰/۹۷۸$) بعد از فعالیت، اثر معناداری بر TNF-α نداشت.



شکل ۱: تولید ROS در عضله EDL. فشار هیدرواستاتیک و سردی آب باعث افزایش بیشتر ROS بعد از فعالیت برونگرا و غوطه‌وری در آب سرد شد. (# علائم معناداری اثر فعالیت برونگرا، &: علائم معناداری اثر فشار هیدرواستاتیک آب، $: علائم معناداری اثر سردی آب).



شکل ۲: مقدار TNF-α در عضله EDL. فشار هیدرواستاتیک و سردی آب باعث افزایش بیشتر TNF-α بعد از فعالیت برونگرا و غوطه‌وری در آب سرد شد. (# علائم معناداری اثر فعالیت برونگرا، &: علائم معناداری اثر فشار هیدرواستاتیکی آب، $: علائم معناداری اثر سردی آب).



تصویر ۱: عکس‌های گرفته شده از عضله EDL بعد از رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی. رنگ قهوه‌ای به طور کیفی وجود TNF-α را نشان می‌دهد. هر چه رنگ قهوه‌ای عکس‌ها پررنگ‌تر باشد TNF-α نیز بیشتر است.

بحث

نتایج نشان داد که نیم ساعت بعد از فعالیت در گروه فعالیت برونگرا، ROS ۶۲ درصد و TNF-α ۸ درصد نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است. نتایج تحقیق حاضر مشابه نتایج فنگ او و همکاران (۹) و قون زو و همکاران (۱۱) می‌باشد که نشان دادند ROS و TNF-α بعد از فعالیت غیر متعارف و تا حد خستگی افزایش می‌یابد. بژما و همکاران (۱۳) نشان دادند که یک جلسه فعالیت ورزشی تا مرز خستگی ROS عضله پهن جانبی (DVL) را ۳۸ درصد افزایش می‌دهد. همچنین، بارسلوس و همکاران (۱۴) در تحقیقی مشابه تحقیق حاضر نشان دادند که بعد از فعالیت برونگرا سایتوکاین‌های پیش‌التهابی از جمله TNF-α افزایش می‌یابد.

فعالیت ورزشی طولانی مدت اکسیژن مصرفی را افزایش داده و منجر به تولید ROS در زنجیره انتقال الکترونی می‌شود (۱۳). گزانتین اکسیداز نیز حین فعالیت ورزشی در فرایند ایسکمی – ریپرفیوژن فعال شده و باعث تولید ROS می‌شود (۱۵). ثابت شده است که هر فعالیت ورزشی که به بیش از ۵۰ درصد انقباض عضلانی اختیاری نیاز داشته باشد منجر به محدودیت موضعی جریان خون می‌شود (۱۶). در چنین شرایطی، کمبود اکسیژن (Hypoxia)، پورین تجزیه می‌شود که متعاقب آن ATP به هیپوگزانتین و هیپوگزانتین توسط گزانتین اکسیداز به اوریک اسید تبدیل می‌گردد که با تولید ROS همراه است (۱۷). ایسکمی حاد منجر به تغییر متابولیسم انرژی به گلیگولیز بی‌هوازی می‌شود که متعاقب آن اسیدوز سلولی را به همراه دارد. اگر شرایط ایسکمی طولانی مدت شود با تخلیه ATP همراه است. ایسکمی طولانی مدت آسیب بافتی را افزایش می‌دهد که با التهاب، ادم میان بافتی و نکروز عضلانی مشخص می‌شود (۱۸ و ۱۹). پاسخ‌های التهابی حین ریکاوری بعد از فعالیت ورزشی تولید سایتوکاین‌های پیش‌التهابی را افزایش می‌دهد (۲۰). TNF-α به عنوان یک سایتوکاین کلیدی است که در تجزیه پروتئین‌های عضلانی و پاسخ‌های ایمنی نقش دارد (۷).

در گروه فعالیت برونگرا، اوج افزایش ROS (۶۲ درصد) و TNF-α (۲۶ درصد) به ترتیب نیم و ۴۸ ساعت بعد از فعالیت ورزشی بود. در این گروه ROS و TNF-α به ترتیب ۷۲ ساعت و ۱۶۸ ساعت بعد از فعالیت برونگرا به مقدار پایه برگشته‌اند. ریتاموزو و همکاران (۱۰) در تحقیق مشابه تحقیق حاضر نشان دادند که فعالیت گزانتین اکسیداز (یکی از عوامل تولید ROS) بعد از یک جلسه فعالیت برونگرا تا ۱۲ ساعت افزایش یافته و سپس کاهش می‌یابد. قون زو و همکاران (۱۱) نیز نشان دادند که یک جلسه فعالیت برونگرا TNF-α را تا دو هفته بعد از فعالیت در عضله Soleus افزایش داده است. در تحقیق حاضر عضله EDL عضله تند انقباض بوده ولی عضله Soleus عضله‌ای کند انقباضی است که کانزو و همکاران مطالعه کرده‌اند. بنابراین، به احتمال زیاد نوع عضله مورد مطالعه در ریکاوری بعد از فعالیت ورزشی بر تغییرات TNF-α می‌تواند اثر گذار باشد. تحقیقات نشان دادند که افزایش کوتاه مدت TNF-α در جریان خون، اثرات منفی بر تغییر و تبدیل پروتئین‌های عضلانی در افراد سالم ندارد، در حالی که افزایش مزمن (طولانی مدت) TNF-α نکروز و آپوپتوز عضلانی را افزایش می‌دهد (۲۱). به نظر می‌رسد که افزایش ROS و TNF-α بعد از فعالیت برونگرا افزایش کوتاه مدت باشد و برای سازگاری-های بعدی نیز مفید واقع شود.

نیم ساعت بعد از فعالیت برونگرا، فشار هیدوراستاتیک آب ROS را ۲۹ درصد و TNF-α را ۲٫۵ درصد کاهش می‌دهد. در حالی که سردی آب ROS را ۱۱ درصد کاهش و TNF-α را ۸ درصد افزایش می‌دهد. مارتینز و همکاران (۲۲) نشان دادند که سرمادرمانی و التراسوند درمانی بعد از کوفتگی شدید فشار اکسیداتیو را کاهش می‌دهد. فورتادو و همکاران (۸) نیز نشان دادند که غوطه‌وری در آب سرد بعد از یک جلسه فعالیت شنا تا حد خستگی تولید ROS را کاهش و فعالیت ضدالتهابی را افزایش می‌دهد. فشار هیدرواستاتیک انتقال مایعات از عضله به جریان خون و حذف متابولیت‌ها را تسهیل می‌کند و انقباض عروقی ناشی از سرمای آب نیز انتشار مایعات به فضای میان بافتی را کاهش می‌دهد (۲۳). کاهش دمای بافت بعضی از پاسخ‌های فیزیولوژیک نظیر تسکین درد را افزایش و متابولیسم، فعالیت آنزیمی و جریان خون عضله را کاهش می‌دهد (۲۴). بنابریان، غوطه‌وری در آب سرد می‌تواند از طریق کاهش ادما، التهاب، درد و تشکیل هماتوم و اثرات آسیب بافتی را کاهش دهد (۲۴). به احتمال زیاد غوطه‌وری در آب سرد بلافاصله بعد از فعالیت ورزشی برونگرا به دلیل ایجاد فشار هیدرواستاتیک و سردی آب، جریان خون بافتی را کاهش داده و کاهش جریان خون آسیب ایسکمی- ریپرفیوژن (Ischemia-Reperfusion) را کاهش می‌دهد. بنابراین، به نظر می-رسد که فشار هیدرواستاتیک و سردی آب در ساعات اولیه بعد از فعالیت اثر مثبتی بر پاسخ‌های اکسیداتیو و التهابی دارد.

کاهش ROS و TNF-α بعد از غوطه‌وری در آب سرد پاسخ‌های اکسیداتیو و التهابی را به طور موقت تعدیل می‌کند. ولی بعد از غوطه‌وری در آب سرد، اثرات فشار هیدرواستاتیک آب و سردی آب منجر به افزایش بیشتر و به تأخیر افتادن اوج افزایش ROS و TNF-α می‌شود به‌طوری که اوج افزایش آنها، در اثر فشار هیدرواستاتیک آب و سردی آب، تقریباً بین ۴۸ تا ۷۲ ساعت بعد از فعالیت برونگرا بود. هم‌چنین، فشار هیدرواستاتیک آب باعث شده است که مقدار ROS و TNF-α یک هفته (۱۶۸ ساعت) بعد از فعالیت برونگرا هم‌چنان بیشتر از گروه کنترل باشد. متعاقب ایسکمی طولانی مدت، ریپرفیوژن (جریان مجدد خون) بافتی، که متحمل فشار ایسکمی شده است، می‌تواند آسیب‌های بعدی را

متحمل شود (۲۵). ریپرفیوژن به تعبیری ریختن سوخت بر روی آتش است (۲۶). در این شرایط تغییرات دیگری نظیر افزایش انباشت کلسیم و افزایش ثانویه تولید ROS نیز بر بافت اضافه می‌شود (۲۵). اگرچه مقدار کم تا متوسط ROS بر سیستم ایمنی و کارکرد ضروری متابولیسم اثرات مثبتی دارد و در مسیر سیگنالینگ سلولی، بیان ژنی و تولید نیروی عضلانی نقش تنظیم کنندگی دارد، ولی مقدار زیاد ROS باعث آسیب DNA، تغییر کارکرد آنزیم‌ها، کاهش تغییر و تبدیل (Remodeling) پروتئین و تخریب جامعیت سلولی می‌شود (۲۵). به احتمال زیاد، بعد از غوطه‌وری در آب سرد، در مرحله گرم شدن، به دلیل افزایش جریان خون عضله (ریپرفیوژن)، ROS و TNF-α افزایش یابد، که متعاقب آن، آسیب ناشی از ایسکمی- ریپرفیوژن نیز افزایش یابد.

افزایش ROS حین ایسکمی می‌تواند منجر به تحریک سیگنال آبشاری NF-ƙB شود که متعاقباً سایتوکاین‌های التهابی نظیر TNF-αرا افزایش می‌دهد (۲۵). از طرف دیگر، TNF-α زنجیره انتقال الکترونی را تخریب کرده و تولید ROS افزایش می‌دهد که این شرایط باعث ایجاد دور باطل بین ROS و TNF-α می‌شود (۶). این مکانیسم بازخورد مثبت نقش مهمی در چندین بیماری ژنتیکی نظیر تحلیل عضلانی، کاشکسی سرطان و سارکوپنی دارد (۲۷ و ۲۸). بنابراین، غوطه‌وری در آب سرد بعد از فعالیت برونگرا ممکن است دور باطل ایجاد شده بین ROS و TNF-α را بیشتر تحریک کند و آسیب‌های ناشی از آن را نیز بیشتر افزایش دهد. در نتیجه غوطه‌وری در آب سرد بعد از فعالیت برونگرا باعث بدتر شدن ریکاوری بعد از فعالیت ورزشی می‌شود.

نتیجه‌گیری

در تحقیق حاضر نشان داده شد که ROS و TNF-α بعد فعالیت برونگرا ابتدا افزایش و سپس کاهش می‌یابد به‌طوری که یک هفته بعد از فعالیت ورزشی برونگرا به مقدار پایه برمی‌گردد. احتمالاً این مقدار افزایش و کاهش ROS و TNF-α برای سازگاری‌های بعدی عضله مناسب باشد. نکته مهم این تحقیق این است که غوطه‌وری در آب سرد نیم ساعت بعد از فعالیت برونگرا به دلیل وجود فشار هیدرواستاتیک و سردی آب اثر کاهشی بر ROS می‌گذارد، ولی بعد از غوطه‌وری در آب سرد، در مرحله گرم شدن، به دلیل ایجاد شرایط ایسکمی- ریپرفیوژن در عضله، دور باطل ایجاد شده بین ROS و TNF-α بیشتر افزایش یافته و ROS و TNF-α را به شدت افزایش می‌دهد. به‌طوری که، در اثر غوطه‌وری در آب سرد هم اوج افزایش و هم مقدار آنها افزایش بیشتری دارد و همچنین، یک هفته بعد از فعالیت ورزشی برونگرا مقدارشان همچنان بیشتر از سطوح پایه می‌باشد که می‌تواند برای عضله مضر واقع شود. به طور کلی، غوطه‌وری در آب سرد بعد از فعالیت‌های ورزشی غیر متعارف، شدید و برونگرا به دلیل ایجاد شرایط مضر برای عضله پیشنهاد نمی‌شود.

محدودیت‌های پژوهش

تعمیم پذیر نبودن یافته‌های حیوانی در مطالعات انسانی برای کاربردی کردن نتایج مطالعه از محدودیت‌های تحقیق می‌باشد.

قدردانی

مطالعه حاضر بر گرفته از رساله دانشجویی دکتری می‌باشد که در دانشکده علوم ورزشی و تندرستی دانشگاه شهید بهشتی تهران انجام شده است. لذا از تمام کسانی که در این تحقیق همکاری داشتند، به ویژه از سرکار خانم دکتر پوران کریمی در جمع‌آوری داده‌ها و از جناب آقای دکتر اکبر آبروش در تحلیل آماری داده‌ها نهایت تشکرات داریم.

ملاحظات اخلاقی

پروتکل این مطالعه در کمیته سازمانی اخلاق در پژوهش‌های زیست پزشکی پژوهشگاه تربیت بدنی استان تهران به شماره مرجع IR.SSRC.1398.065 به تایید رسیده است.

منابع مالی

منابع مالی ندارد..

منافع متقابل

مؤلفان اظهار می‌دارند که منافع متقابلی از تالیف یا انتشار این مقاله ندارد.

مشارکت مؤلفان

ت.ه.ب، م.ن، ر.ف.م و س.پ طراحی، اجرا و تحلیل نتایج مطالعه را بر عهده داشتند. همچنین مقاله را تالیف نموده و نسخه نهایی آن را خوانده و تایید کرده‌اند.

References

1. Rattray B, Argus C, Martin K, Northey J, Driller M. Is it time to turn our attention toward central mechanisms for post-exertional recovery strategies and performance? Frontiers in Physiology. 2015;6(79):1-14. doi: 10.3389/fphys.2015.00079

2. Luttrell MJ, Halliwill JR. Recovery from exercise: vulnerable state, window of opportunity, or crystal ball? Frontiers in physiology. 2015;6(204):1-6. doi: 10.3389/fphys.2015.00204
3. White GE, Wells GD. Cold-water immersion and other forms of cryotherapy: physiological changes potentially affecting recovery from high-intensity exercise. Extreme physiology & medicine. 2013;2(1-26):1-11. doi:10.1186/2046-7648-2-26
4. Leeder J, Gissane C, van Someren K, Gregson W, Howatson G. Cold water immersion and recovery from strenuous exercise: a meta-analysis. British Journal of Sports Medicine. 2011;46(4):233-40. doi: 10.1136/bjsports-2011-090061
5. Broatch JR, Petersen A, Bishop DJ. The influence of post-exercise cold-water immersion on adaptive responses to exercise: a review of the literature. Sports Medicine. 2018;48(6):1369-87. doi: 10.1007/s40279-018-0910-8
6. Liao P, Zhou J, Ji LL, Zhang Y. Eccentric contraction induces inflammatory responses in rat skeletal muscle: role of tumor necrosis factor-α. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. 2009;298(3):599-607. doi: 10.1152/ajpregu.00480.2009
7. Theodorou AA, Nikolaidis MG, Paschalis V, Koutsias S, Panayiotou G, Fatouros IG, et al. No effect of antioxidant supplementation on muscle performance and blood redox status adaptations to eccentric training. The American journal of clinical nutrition. 2011;93(6):1373-83. doi: 10.3945/ajcn.110.009266
8. Furtado A, Hartmann D, Martins R, Rosa P, da Silva I, Duarte B, et al. Cryotherapy: biochemical alterations involved in reduction of damage induced by exhaustive exercise. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 2018;51(11):1-8. doi: 10.1590/1414-431x20187702
9. He F, Li J, Liu Z, Chuang C-C, Yang W, Zuo L. Redox mechanism of reactive oxygen species in exercise. Frontiers in Physiology. 2016;7(486):1-10. doi: 10.3389/fphys.2016.00486
10. Retamoso LT, Junior MES, Lima FD, Busanello GL, Bresciani G, Ribeiro LR, et al. Increased xanthine oxidase-related ROS production and TRPV1 synthesis preceding DOMS post-eccentric exercise in rats. Life Sciences. 2016;152:52-9. doi: 10.1016/j.lfs.2016.03.029
11. Zuo Q, Qu F, Li N, Wang S, Liu J, Xu C, et al. Eccentric exercise results in a prolonged increase in interleukin-6 and tumor necrosis factor-α levels in rat skeletal muscle. Journal of Muscle Research and Cell Motility. 2019;40(3-4):379-87. doi: 10.1007/s10974-019-09554-6
12. Tsumiyama W, Oki S, Takamiya N, Umei N, Shimizu ME, Ono T, et al. Aerobic interval exercise with an eccentric contraction induces muscular hypertrophy and augmentation of muscular strength in rats. Journal of Physical Therapy Science. 2015; 27(4): 1083-1086. doi: 10.1589/jpts.27.1083
13. Bejma J, Ji LL. Aging and acute exercise enhance free radical generation in rat skeletal muscle. Journal of Applied Physiology. 1999;87(1):465-70. doi: 10.1152/jappl.1999.87.1.465
14. Barcelos RP, Bresciani G, Cuevas MJ, Martínez-Flórez S, Soares FAA, González-Gallego J. Diclofenac pretreatment modulates exercise-induced inflammation in skeletal muscle of rats through the TLR4/NF-κB pathway. Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism. 2017;42(7):757-64. doi: 10.1139/apnm-2016-0593
15. Hellsten Y, Frandsen U, Orthenblad N, Sjødin B, Richter EA. Xanthine oxidase in human skeletal muscle following eccentric exercise: a role in inflammation. The Journal of Physiology. 1997;498(1):239-48. doi: 10.1113/jphysiol.1997.sp021855
16. Williams MA, Haskell WL, Ades PA, Amsterdam EA, Bittner V, Franklin BA, et al. Resistance exercise in individuals with and without cardiovascular disease: 2007 update: a scientific statement from the American Heart Association Council on Clinical Cardiology and Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. Circulation. 2007;116(5):572-84. doi: 10.1161/circulationaha.107.185214
17. Shibata N, Kobayashi M. The role for oxidative stress in neurodegenerative diseases. Brain and Nerve Shinkei Kenkyu No Shinpo. 2008;60(2):157-70. doi: 10.1201/b16653-23
18. Moreira Neto AA, Souza Júnior SSd, Capelozzi VL, Parra-Cuentas ER, Júnior S, Fernandes A, et al. Effects of cilostazol in kidney and skeletal striated muscle of Wistar rats submitted to acute ischemia and reperfusion of hind limbs. Acta cirurgica brasileira. 2012;27(11):783-8. doi: 10.1590/s0102-86502012001100007
19. Zaccagnini G, Palmisano A, Canu T, Maimone B, Russo FML, Ambrogi F, et al. Magnetic resonance imaging allows the evaluation of tissue damage and regeneration in a mouse model of critical limb ischemia. PLoS One. 2015;10(11):11-21. doi: 10.1371/journal.pone.0142111
20. Paulsen G, Ramer Mikkelsen U, Raastad T, Peake JM. Leucocytes, cytokines and satellite cells: what role do they play in muscle damage and regeneration following eccentric exercise? Exercise Immunology Review. 2012;18(2):183-92. doi: 10.15857/ksep.2009.18.2.183
21. Hardin BJ, Campbell KS, Smith JD, Arbogast S, Smith J, Moylan JS, et al. TNF-α acts via TNFR1 and muscle-derived oxidants to depress myofibrillar force in murine skeletal muscle. Journal of Applied Physiology.

2008;104(3):694-9. doi: 10.1152/japplphysiol.00898.2007
22. Martins C, Moraes M, Hauck M, Guerreiro L, Rossato D, Varela Jr A, et al. Effects of cryotherapy combined with therapeutic ultrasound on oxidative stress and tissue damage after musculoskeletal contusion in rats. Physiotherapy. 2016;102(4):377-83. doi: 10.1016/j.physio.2015.10.013
23. Leeder J, Gissane C, van Someren K, Gregson W, Howatson G. Cold water immersion and recovery from strenuous exercise: a meta-analysis. Br J Sports Med. 2012;46(4): 233-40. doi: 10.1136/bjsports-2011-090061
24. Howatson G, Van Someren KA. The prevention and treatment of exercise-induced muscle damage. Sports Medicine. 2008;38(6):483-503. doi: 10.2165/00007256-200838060-00004
25. Franz A, Behringer M, Nosaka K, Buhren BA, Schrumpf H, Mayer C, et al. Mechanisms underpinning protection against eccentric exercise-induced muscle damage by ischemic preconditioning. Medical Hypotheses. 2017;98:21-7. doi: 10.1016/j.mehy.2016.11.008
26. Cooper ST, McNeil PL. Membrane repair: mechanisms and pathophysiology. Physiological reviews. 2015;95(4):1205-40. doi: 10.1152/physrev.00037.2014
27. Cai D, Frantz JD, Tawa Jr NE, Melendez PA, Oh B-C, Lidov HG, et al. IKKβ/NF-κB activation causes severe muscle wasting in mice. Cell. 2004;119(2):285-98. doi: 10.1016/j.cell.2004.09.027
28. Goodman MN. Tumor necrosis factor induces skeletal muscle protein breakdown in rats. American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism. 1991;260(5):727-30. doi: 10.1152/ajpendo.1991.260.5.e727