

## Integrazione con antiossidanti negli atleti professionisti : il ruolo del laboratorio

Andrea Bolner<sup>1</sup>, Piero Volpi<sup>2,3</sup>, Matteo Pincella<sup>3</sup>, Natale Gentile<sup>3</sup>, Federica Sprenger<sup>3</sup>, Carlo Berizzi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Oxilab, Villafranca di Verona

<sup>2</sup>Istituto Clinico Humanitas IRCCS Rozzano, Milano

<sup>3</sup>Settore Medico Football Club Internazionale Milano

### ABSTRACT

#### Integration with antioxidants in athletes: the role of the laboratory

**Introduction:** the use of antioxidant supplements in athletes is frequent but rarely the choice is based on preliminary biochemical tests. Aim of our work was to verify the usefulness of some blood and urinary markers of oxidative and inflammatory balance in a case of antioxidant supplementation involving athletes of an elite women's football team.

**Methods:** in preparation for an increased workload, 22 players took a food supplement containing N-acetylcysteine (NAC) for 30 days. At the beginning and at the end of this period, some biomarkers of muscle physiology, inflammation, redox balance and oxidative damage were measured.

**Results:** after supplementation, total antioxidant barrier remained unchanged and anti-inflammatory capacity increased despite the higher workload. However, the measurement of oxidative damage markers did not allow us to reach useful conclusions.

**Discussion:** redox balance, glutathione, IL-6 and IL-10 measurements before supplementation showed an initial oxidative-inflammatory balance, and have proven useful for evaluating the effects of the antioxidant treatment. The maintenance of oxidative balance and the increase in anti-inflammatory capacity seem to indicate its effectiveness. Unfortunately, the lack of a control group prevented us from attributing the beneficial effects to the treatment alone.

Supplementation with antioxidants in sport should be a thoughtful choice based on a preliminar assessment of the athlete's real needs. The role of the laboratory is crucial to evaluate the oxidative balance of athletes, to plan the integration and subsequently to measure the effects of supplementation.

**Parole chiave:** medicina sportiva, antiossidanti, stress ossidativo

### INTRODUZIONE

L'esercizio fisico produce radicali liberi, cioè specie molecolari altamente reattive dell'ossigeno (ROS) e dell'azoto (RNS) che agiscono come fattori di stress promuovendo modificazioni molecolari e adattamenti tissutali (1-2). A seconda dell'entità di produzione dei radicali ROS e RNS e dei loro rapporti di concentrazione con le molecole che compongono la barriera antiossidante fisiologica, lo stress che consegue all'attività fisica può avere effetti opposti. Un esercizio moderato potenzia la barriera favorendo la sovraespressione degli enzimi antiossidanti ed "allena" l'organismo a rispondere con sempre maggiore efficacia allo stress ossidativo (3). L'esercizio non abituale, ad alta

intensità, prolungato o faticoso può invece consumare progressivamente la capacità antiossidante fisiologica fino a sbilanciare l'equilibrio ed indurre danni ossidativi cellulari (4). L'innescò della risposta antiossidante attraverso l'esercizio fisico è un concreto esempio del concetto di ormesi per il quale stimolazioni di basso grado possono indurre effetti adattativi favorevoli, mentre dosi più elevate espongono al rischio di eventi dannosi (5). Poiché nel corso della stagione agonistica possono verificarsi situazioni in cui i carichi di lavoro degli atleti sono molto elevati, il ricorso all'integrazione nutrizionale con antiossidanti è una pratica che mira ad ottenere una maggiore protezione verso gli insulti ossidativi, a prevenire gli infortuni e, ove possibile, a migliorare le prestazioni (6).

Corrispondenza a: Andrea Bolner, Oxilab, Villafranca di Verona (VR), Email: bolner.andrea@gmail.com

Ricevuto: 10.10.2023

Revisionato: 14.11.2023

Accettato: 07.02.2024

Publicato Online: 26.02.2024

DOI: 10.19186/BC\_2024.012

È noto che l'equilibrio ossidativo è il risultato dei rapporti di concentrazione tra molecole capaci di scambiare elettroni in funzione del loro potenziale di ossidoriduzione. Il glutatione è uno tra i più importanti antiossidanti endogeni e le misure della concentrazione ematica della sua forma ridotta (GSH) ed ossidata (GSSG) sono spesso utilizzate per evidenziare alterazioni dell'equilibrio ossidativo. Precedenti lavori hanno dimostrato che l'allenamento fisico è in grado di spostare il potenziale elettrochimico della coppia GSH/GSSG verso un ambiente più riducente o più ossidante a seconda del carico di lavoro muscolare degli atleti (7-9). L'instaurarsi di condizioni tissutali pro-ossidanti favorisce l'innescò di processi infiammatori di basso grado che, quando rimangono al di sotto di una certa soglia, specifica per ogni atleta, permettono l'adattamento fisiologico al carico allenante. Il superamento della soglia rischia invece di portare ad una condizione di sovra-allenamento nella quale l'infiammazione e lo stress ossidativo si auto-alimentano in un circolo vizioso che compromette lo stato di salute e le prestazioni (10-12). Per prevenire questi rischi, il ricorso alle integrazioni con antiossidanti è frequente specialmente a livello agonistico, ma raramente la scelta si fonda su accertamenti biochimici preliminari nonostante la potenziale rilevanza delle conseguenze. Anche nelle integrazioni con antiossidanti infatti, si esplicita il concetto di ormesi. Moderate quantità di antiossidanti esogeni, assunti preferibilmente in concentrazioni e miscele che riproducono quelle di alcuni alimenti naturali che ne sono ricchi (13), sostengono la barriera antiossidante senza interferire eccessivamente con l'infiammazione indotta dall'esercizio ed il conseguente adattamento fisiologico. A dosi più elevate invece, gli integratori somministrati possono sbilanciare in senso opposto l'equilibrio ed avere effetti pro-ossidanti che ostacolano la risposta adattativa all'allenamento.

L'obiettivo di proteggere efficacemente gli atleti in periodi di allenamento intenso con una adeguata integrazione antiossidante non dovrebbe pertanto prescindere da una attenta pianificazione che consideri le reali necessità di ciascun atleta. Il ricorso ad analisi di laboratorio in grado di misurare alcuni tra i principali marcatori dell'equilibrio ossidativo e del quadro infiammatorio può assumere un importante valore (14).

L'eterogeneità degli approcci analitici e la debolezza di alcune metodiche utilizzate per queste misure nei molti studi riportati in letteratura sono state spesso motivo di incertezze che, unite alla diversità dei contesti sperimentali e delle dosi somministrate, hanno portato a conclusioni contrastanti circa l'utilità delle integrazioni (15-16).

Scopo di questo lavoro è stato quello di verificare l'utilità della misurazione di alcuni marcatori ematici ed urinari del quadro ossidativo ed infiammatorio in un contesto di integrazione con antiossidanti che ha riguardato le atlete di una squadra di calcio femminile d'élite. In particolare, abbiamo voluto appurare se il pannello di esami utilizzato era in grado di fornire informazioni utili a suggerire il ricorso all'integrazione ed a misurarne gli effetti.

## METODI

### Popolazione studiata e modalità di valutazione

L'intero studio è stato svolto rispettando ed applicando la Dichiarazione di Helsinki del 1975, come emendata nel 2013. Nella seconda parte della stagione agonistica, 22 giocatrici professioniste di una squadra di calcio del campionato italiano di serie A, di età media (DS) 26,5 (1,4) anni e indice di massa corporea 22,5 (1,4), dopo più di un mese di sospensione di ogni trattamento analogo, hanno assunto un integratore alimentare contenente antiossidanti. Il prodotto, scelto sulla base della documentazione scientifica fornita dal produttore (AVD Reform, Noceto, Italia) è stato somministrato per 30 giorni consecutivi secondo le modalità e la posologia suggerite. Nel corso dell'intervento, il normale piano nutrizionale seguito dal gruppo da inizio stagione non è stato modificato. La dieta prevedeva l'assunzione di 3-6 g di carboidrati e 1,6-2 g di proteine per kg di peso corporeo, acidi grassi saturi in quantità inferiori al 10% del fabbisogno calorico totale, acidi grassi poli-insaturi tra il 5 e il 10% (4-8% omega-6 e 0,5-2% omega-3) e colesterolo in quantità inferiori a 300 mg/giorno per un introito calorico complessivo di 40-52 kcal/kg massa magra/giorno. Durante lo studio la varietà degli alimenti vegetali non è cambiata rispetto al mese precedente e non è stata effettuata alcuna integrazione oltre a quella in esame. Settimanalmente tutte le atlete sono state sottoposte al controllo del peso corporeo e alla misura rifrattometrica del peso specifico urinario eseguita su campioni del mattino (Atago, Tokyo); inoltre, all'inizio e alla fine dello studio è stato misurato lo stato di idratazione mediante impedenziometria (Quantum V, RJL Systems, Detroit, USA). Prima della somministrazione dell'integratore i medici di squadra hanno informato le atlete circa la natura e finalità della stessa e soprattutto riguardo alla facoltà di interromperla a loro discrezione e in qualsiasi momento, per quanto si trattasse di prodotto non dopante, disponibile in commercio e utilizzabile a piacimento senza prescrizioni. L'integrazione è consistita nell'assunzione giornaliera di 900 mg di N-acetilcisteina (NAC), 3 g di curcuma (*Curcuma longa*, titolo 12,5% in turmerosaccaridi), 300 mg di *Haematococcus pluvialis*, alga unicellulare produttrice del carotenoide astaxantina (titolo 5%) e 180 mg di ribes nero contenente antocianine (titolo 35%). Un'atleta ha scelto di sospendere anticipatamente l'assunzione dell'integratore e per tale ragione non è stata considerata nell'elaborazione finale dei dati.

### Analisi di laboratorio

In occasione dei controlli ematochimici periodici coincisi con l'inizio (V0) ed il termine (V1) del periodo di integrazione, le atlete sono state sottoposte a prelievo ematico, previa sottoscrizione di consenso informato. I campioni di sangue sono stati raccolti a riposo, 48 ore dopo l'ultima partita, in provette sottovuoto senza anticoagulante: dopo centrifugazione a 3500 giri/min per 10 minuti a 4 °C, i campioni di siero sono stati congelati a -80 °C fino al momento dell'analisi. Contestualmente

sono stati raccolti e subito congelati anche campioni di sangue intero con EDTA ed aliquote delle prime urine del mattino.

Entro 10 giorni dalla raccolta sono stati analizzati i marcatori sierici di fisiologia muscolare creatinasi (CK) ed irisina e di infiammazione: proteina C-reattiva (CRP), interleuchina-6 (IL-6) e interleuchina-10 (IL-10). Sono stati inoltre misurati i marcatori di equilibrio ossidativo perossidi totali (dROMs), barriera antiossidante totale (BAP), tioli (SH) e indice redox. Nel sangue intero EDTA sono stati misurati il glutatione totale (GSH+GSSG), ossidato (GSSG) e ridotto (GSH) e nel siero e nelle urine i marcatori di danno ossidativo 8-idrossi-guanina (8OHGua), 2-deossi-guanosina (2dG), 8-idrossi-deossi-guanosina (8OHdG), 3-nitrotirosina (3-NT), di-tirosina (diTyr).

La concentrazione dei marcatori urinari è stata normalizzata in funzione dei valori della creatinina. Le unità di misura, i valori di riferimento, gli strumenti e le caratteristiche dei metodi utilizzati per la misura dei parametri biochimici sono elencati nella Tabella 1.

Tutti gli esami colorimetrici ed immunochimici sono stati eseguiti in automazione: per le analisi in cromatografia liquida (HPLC) e spettrometria di massa (LC-MS/MS) sono stati utilizzati kit commerciali, completi di calibratori e standard interni. Il controllo di qualità è stato eseguito mediante matrici a titolo noto a 2 livelli di concentrazione.

Durante il periodo di integrazione sono state effettuate le misurazioni dei carichi di lavoro delle atlete con sistema Global Positioning System (GPS): sono stati rilevati la durata media complessiva delle sedute di allenamento, delle partite ufficiali ed amichevoli, le distanze percorse, il numero di accelerazioni e decelerazioni e di eventi ad alta intensità. Le rilevazioni GPS sono state utilizzate allo scopo di valutare se nel periodo di osservazione il lavoro muscolare delle atlete fosse cambiato rispetto a quello del mese precedente lo studio.

### Analisi statistica

I dati sono stati elaborati per ottenere medie, deviazioni standard (DS), mediane e intervalli interquartile (IQR). A causa dell'asimmetria nella distribuzione della maggior parte dei parametri misurati, l'analisi statistica è stata eseguita principalmente considerando le mediane e gli IQR espressi come primo e terzo quartile.

In mancanza del gruppo di controllo, i dati ottenuti alle visite V0 e V1 sono stati valutati per confronto con i valori di differenza critica disponibili in letteratura per gli analiti misurati (reference change values, RCV%) (9,17,18). In particolare, le differenze percentuali delle mediane calcolate per ciascun analita tra la visita V1 e V0 [ $\text{delta\%} = (V1-V0)/V0 \times 100$ ], sono state confrontate con i rispettivi RCV%: i delta% che superavano in valore assoluto i corrispondenti RCV% sono stati considerati indicativi di variazioni clinicamente significative (Tabella 1).

Le variazioni dei dati ottenuti dopo l'integrazione sono state inoltre valutate con il test statistico non parametrico di Wilcoxon, avendo posto come criterio di significatività il valore  $p < 0,05$ .

Per stimare la possibile incidenza dei carichi di lavoro individuali sui risultati è stata condotta un'analisi multivariata con regressione lineare delle misure degli analiti (variabili dipendenti) e delle rilevazioni GPS (variabili indipendenti). Poiché il modello di regressione prende in esame i valori medi delle grandezze misurate, è stato eseguito un preliminare test Kolmogorov-Smirnov per verificare l'ipotesi di normalità: oltre che sui dati grezzi, il test è stato eseguito anche sulle loro trasformazioni normalizzanti logaritmo decimale, radice quadrata e reciproco. I confronti mediante t-test tra le medie alle visite V0 e V1 e l'analisi multivariata sono state successivamente condotte solo sulle variabili per le quali almeno 3 delle 4 serie di dati, grezzi e trasformati, hanno indicato univocamente la non esclusione dell'ipotesi di normalità.

### RISULTATI

Come in parte previsto e motivo per il quale l'integrazione era stata pianificata, le misurazioni GPS hanno dimostrato che il carico allenante nel periodo di osservazione ha subito un incremento statisticamente significativo rispetto al mese precedente, soprattutto in relazione alla durata delle attività, alle distanze percorse e al numero di eventi ad alta intensità registrati (Tabella 2). Il peso corporeo, il peso specifico urinario e lo stato di idratazione sono invece rimasti pressoché costanti tra V0 e V1 per tutte le atlete, con oscillazioni comprese tra 0,5 e 2%.

Alla visita V1, sia CK che irisina erano diminuiti rispetto a V0 (delta% -12% e -17% rispettivamente) (Tabella 3). Per CK, solo in pochi casi (4/21) le diminuzioni hanno superato l'RCV% e il test di Wilcoxon ha confermato la non significatività delle variazioni; diversamente, per l'irisina la statistica ha evidenziato una diminuzione significativa.

I marcatori del quadro infiammatorio, CRP e IL-6 sono aumentati alla V1 ma sono rimasti per tutti i soggetti all'interno dei valori di riferimento. IL-10 invece, già oltre soglia alla V0, è ulteriormente incrementata per tutti alla V1 con significatività statistica.

Nessuno dei parametri di equilibrio ossidativo dROMs, BAP e indice redox è variato in modo clinicamente significativo tra V0 e V1 (delta% compresi tra 0 e -2 % e in nessun caso oltre RCV%) ed anche il test di Wilcoxon ha dato esito negativo. In tutti i soggetti, i valori di dROMs e BAP, rispettivamente superiori ed inferiori al valore desiderabile, hanno evidenziato un quadro tipico degli atleti in attività, con perossidi totali sierici aumentati (espressione della concentrazione di radicali liberi) e barriera antiossidante sotto soglia ma sufficiente a mantenere l'equilibrio omeostatico, come evidenziato dall'indice redox mantenutosi in tutti i casi a livelli desiderabili ( $> 1,00$ ).

Tra i marcatori della barriera antiossidante endogena non enzimatica, il glutatione ridotto GSH era diminuito senza significatività clinica (mediana -6%, nessun caso oltre RCV%) mentre la forma ossidata GSSG era significativamente incrementata (+154%, 12/21 casi) con conseguente diminuzione del rapporto GSH/GSSG (-61%, 16/21 casi). Le variazioni di GSSG e GSH sono risultate anche statisticamente significative.

**Tabella 1**

Elenco dei biomarcatori misurati, loro unità di misura, metodi, intervalli di riferimento, Reference Change Value (RCV%) (8, 18), sistemi analitici e relativi produttori. Per ciascun metodo sono indicati i limiti di sensibilità (LOD), inferiore (LLOQ) e superiore (ULOQ) di quantificazione. Le caratteristiche di precisione intra ed inter-saggio sono state ricavate dai programmi di controllo di qualità interno eseguiti su matrici a 2 livelli: sono riportati i CV% medi calcolati e il numero dei dati considerati per il calcolo (n).

Biomarcatore	Unità di misura	Metodo	LOD	LLOQ	ULOQ	CV% intra	CV% inter	Intervallo di Riferimento	RCV%	Sistema analitico	Produttore
Metabolismo muscolare											
S-Creatininchinasi (CK)	U/L	enzimatico	5	5	1200	2,6 (n=153)	2,8 (n=82)	26-192	43	AU 5800 Beckman Coulter, Milano	Beckman Coulter, Milano
S-Irisina	mg/L	elisa	0,001	0,001	5,0	4,9 (n=15)	8,0 (n=6)	15,0-25,0 (diluito 1:20)	-	ThunderBolt GSD, Davis, USA	Adipogen, Fullinsdorf, Svizzera
Infiammazione											
S-Proteina C reattiva (hsCRP)	mg/L	turbidimetria	0,06	0,2	60,0	3,0 (n=153)	3,8 (n=82)	<1,0	-	DXI 800 Beckman Coulter, Milano	Beckman Coulter, Milano
S-Interleuchina 6 (IL-6)	ng/L	elisa ad alta sensibilità	0,03	0,08	5,0	3,1 (n=42)	4,5 (n=21)	0,1-2,0	-	ThunderBolt GSD, Davis, USA	Tecan, Hombrechtikon, Svizzera
S-Interleuchina 10 (IL-10)	ng/L	elisa ad alta sensibilità	0,05	0,08	25,0	3,7 (n=40)	6,1 (n=20)	0,1-5,0	-	ThunderBolt GSD, Davis, USA	Tecan, Hombrechtikon, Svizzera
Equilibrio ossidativo											
S-Specie reattive dell'ossigeno (dROMs)	U cair	colorimetrico	11	40	1000	2,1 (n=82)	1,8 (n=41)	Valore desiderabile <300	30	ThunderBolt GSD, Davis, USA	Diacron, Grosseto
S-Potenziale biologico antiossidante (BAP)	uEq/L	colorimetrico	150	500	6000	2,1 (n=82)	3,1 (n=41)	Valore desiderabile >2200	33	ThunderBolt GSD, Davis, USA	Diacron, Grosseto
S-Indice redox	ratio	calcolo	-	-	-	-	-	Valore ottimale >1,0	39		
Barriera antiossidante endogena non enzimatica											
Sg-Glutazione ridotto (GSH)	umol/L	HPLC-FL	16	32	3200	3,3 (n=22)	4,2 (n=11)	500-1500	37	Agilent 1100, Santa Clara, USA	Eureka Lab Division, Chiaravalle
Sg-Glutazione ossidato (GSSG)	umol/L	HPLC-FL	16	32	3200	4,1 (n=22)	5,2 (n=11)	<150	36	Agilent 1100, Santa Clara, USA	Eureka Lab Division, Chiaravalle
Sg-Glutazione ridotto/ossidato (GSH/GSSG)	umol/L	calcolo	-	-	-	-	-	>20	17		
S-Tioli (SH)	umol/L	colorimetrico	10	35	2000	2,4 (n=18)	3,2 (n=9)	>450	-	ThunderBolt GSD, Davis, USA	Diacron, Grosseto

**Tabella 1 - Continua**

Biomarcatore	Unità di misura	Metodo	LOD	LLOQ	ULOQ	CV% intra	CV% inter	Intervallo di Riferimento	RCV%	Sistema analitico	Produttore
Danno ossidativo											
S-3-nitro-Tirosina (3NT)	µg/L	LC-MS/MS	0,05	0,1	1000	2,2 (n=46)	3,0 (n=23)	<5,0	77		
S-di-Tirosina (diTYR)	µg/L	LC-MS/MS	0,08	0,1	1000	2,8 (n=46)	3,3 (n=23)	<5,0	-		
S-8-idrossi-deossi-guanosina (8OHdG)	µg/L	LC-MS/MS	0,08	0,1	1000	2,1 (n=46)	3,8 (n=23)	<5,0	-		
S-2-deossi-guanosina (2dG)	µg/L	LC-MS/MS	0,005	0,01	1000	2,3 (n=46)	2,9 (n=23)	<5,0	-		
S-8-idrossi-guanina (8OHGua)	µg/L	LC-MS/MS	0,05	0,1	1000	2,9 (n=46)	3,7 (n=23)	<18,0	-		Eureka Lab Division, Chiaravalle
U-3-nitro-Tirosina (3NT)	µg/g creat	LC-MS/MS	0,05	0,1	1000	2,0 (n=70)	3,6 (n=35)	<8,3	-	Waters TQD, Framingham, USA	
U-di-Tirosina (diTYR)	µg/g creat	LC-MS/MS	0,08	0,1	1000	2,3 (n=70)	3,1 (n = 35)	<26,0	-		
U-8-idrossi-deossi-guanosina (8OHdG)	µg/g creat	LC-MS/MS	0,08	0,1	1000	2,1 (n=70)	2,7 (n=35)	<7,6	80		
U-2-deossi-guanosina (2dG)	µg/g creat	LC-MS/MS	0,005	0,01	1000	2,4 (n=70)	3,0 (n=35)	<2,8	125		
U-8-idrossi-guanina (8OHGua)	µg/g creat	LC-MS/MS	0,05	0,1	1000	2,0 (n=70)	2,9 (n=35)	<29,1	-		

*HPLC, cromatografia liquida, LC-MS/MS, spettrometria di massa.*

**Tabella 2**

Statistica descrittiva dei carichi di lavoro nel mese precedente (P) e del mese di integrazione (I): per ogni parametro sono riportati mediana, intervallo interquartile (IQR, espresso come primo - terzo quartile), differenze percentuali tra i due mesi delle mediane (delta%) calcolate come  $(I-P)/P \times 100$  e le relative significatività al test di Wilcoxon (p).

	Mese precedente (P)		Mese di integrazione (I)		delta% I versus P	p
	mediana	IQR	mediana	IQR		
Durata (min)	72,3	70,7–74,1	78,0	76,2–79,2	+8	<0,01
Distanza (m)	4896	4655-5081	5362	5110-5715	+10	0,01
Accelerazioni (numero)	7,7	5,9–11,9	8,4	7,2–13,5	+9	0,03
Decelerazioni (numero)	9,3	7,1–12,1	11,4	7,3–13,8	+23	0,07
Eventi ad alta intensità (numero)	58,6	51,6–64,0	65,1	55,9–73,6	+11	0,15
Distanza (m) percorsa a 14,4-19,8 km/h	473	425-555	591	456-644	+25	0,01
Distanza (m) percorsa a 19,8-25,2 km/h	108	90-158	97	80-119	-10	0,03
Distanza (m) percorsa a >25,2 km/h	5	2-10	3	1-7	-40	<0,01

**Tabella 3**

Statistica descrittiva dei marcatori misurati prima (V0) e dopo integrazione con antiossidanti (V1): per ogni parametro sono riportati mediana, intervallo interquartile (IQR, espresso come primo - terzo quartile), differenze percentuali (delta%) tra le due visite e le relative significatività al test di Wilcoxon (p). Sono evidenziate con l'asterisco le differenze percentuali che superano l'RCV%.

	V0		V1		delta% V1 versus V0	p
	mediana	IQR	mediana	IQR		
S-Creatin chinasi	164	112-240	144	105-197	-12	0,53
S-Irisina	20,5	14,2-22,4	17,0	11,7–20,5	-17	0,04
S-Proteina C reattiva	0,44	0,28-0,82	0,56	0,25–0,92	+27	0,37
S-Interleuchina 6 (IL-6)	0,3	0,2-0,9	0,4	0,2-0,6	+33	0,46
S-Interleuchina 10 (IL-10)	6,7	5,7-7,3	7,4	6,1–8,8	+10	0,02
S-IL-6/IL-10	0,05	0,03-0,15	0,04	0,02–0,08	-20	0,10
S-Specie reattive dell'ossigeno (dROMs)	329	299-350	323	286-339	-2	0,23
S-Potenziale biologico antiossidante (BAP)	1947	1867-2098	1942	1884-2019	0	0,31
S-Indice redox	1,14	1,05-1,29	1,12	1,04-1,31	-2	0,66
Sg-Glutatione ridotto (GSH)	1169	1097-1378	1101	1059-1183	-6	0,01
Sg-Glutatione ossidato (GSSG)	46	24-84	117	48-168	+154*	0,02
Sg-GSH/GSSG	24,7	15,0-64,5	9,6	6,8-23,0	-61*	0,08
S-Tioli (SH)	607	557-706	714	648-746	+18	<0,01
S-3-nitro-Tirosina (3NT)	3,0	2,9-3,1	2,4	2,9-3,1	-20	<0,01
S-di-Tirosina (diTYR)	1,9	1,7-2,0	1,9	1,8-2,0	0	0,54
S-8-idrossi-deossi-guanosina (8OHdG)	0,7	0,6-0,8	0,7	0,6-0,8	0	0,55
S-2-deossi-guanosina (2dG)	1,0	0,8-1,1	1,0	0,8-1,1	0	0,27
S-8-idrossi-guanina (8OHGua)	13,1	8,8-23,1	9,0	5,4-15,9	-31	0,10
U-3-nitro-Tirosina (3NT)	3,2	0,6-18,4	2,8	1,0-6,4	-13	0,05
U-di-Tirosina (diTYR)	19,1	16,0-22,7	21,2	18,6-23,2	+11	0,13
U-8-idrossi-deossi-guanosina (8OHdG)	5,2	3,6-5,8	6,0	4,4-7,8	+15	0,01
U-2-deossi-guanosina (2dG)	2,1	0,9-2,8	1,6	0,9-2,8	-24	0,48
U-8-idrossi-guanina (8OHGua)	16,4	9,6-25,2	13,5	9,3-23,6	-18	0,40

I tioli sierici SH, già pienamente nella norma e superiori alla soglia minima di riferimento alla V0, sono ulteriormente aumentati per tutti i soggetti alla V1 (mediana +18%) in modo statisticamente significativo.

Sia alla V0 che alla V1, tutti i marcatori di danno ossidativo, tanto sierici quanto urinari, erano presenti in basse concentrazioni, con valori sempre all'interno degli intervalli di riferimento. Le diminuzioni di 3-NT alla V1 nel siero (mediana -20%, nessun caso oltre RCV%) e nelle urine (mediana -13%) sono risultate statisticamente ma non clinicamente significative. I valori di 8OHGua, diminuiti in tutti i soggetti sia nel siero (mediana -31%) che nelle urine (-18%) sono variati senza significatività statistica. I modesti incrementi di 8OHdG (mediana +15%, nessun caso oltre RCV% e test di Wilcoxon positivo) e le diminuzioni di 2dG (mediana -24%, nessun caso oltre RCV%) nelle sole urine ed invariati nel siero, sono risultati clinicamente non significativi.

Il test Kolmogorov-Smirnov condotto su 23 variabili dipendenti (elencate nella Tabella 3) ha indicato che l'ipotesi di normalità doveva essere rifiutata con livello di significatività del 5% in 13 casi per i dati non trasformati, 7 per i logaritmi decimali, 11 per le radici quadrate e 12 casi per i reciproci. Solo per le variabili dipendenti, CK, irisina, IL-10, GSH, GSSG, GSH/GSSG, dROMs, BAP, indice redox, S-OHGua ed SH, l'ipotesi di normalità non poteva essere esclusa per almeno 3 delle 4 serie di dati. Anche 3 delle 8 variabili indipendenti in studio (Tabella 2), durata, distanza ed eventi ad alta intensità, non hanno mostrato evidenti deviazioni dalla normalità. Il confronto tra le medie di queste variabili eseguito mediante t-test ha confermato la significatività statistica delle variazioni alla V1 per GSH, GSSG, SH, durata e distanza, già evidenziate con il test di Wilcoxon. Dopo aver tenuto conto dell'effetto delle variabili indipendenti durata, distanza ed eventi ad alta intensità con l'analisi di regressione multipla, le variazioni di GSSG ed SH, statisticamente significative al t-test, hanno perso significatività. La variazione di GSH si è invece confermata significativa ( $p < 0,01$ ): per questo marcatore, considerando una probabilità di mettere in evidenza un effetto (potenza) superiore all'80%, la dimensione campionaria calcolata a posteriori è risultata pari a 16 soggetti.

## DISCUSSIONE

È noto che l'esercizio fisico produce radicali liberi che tendono a consumare specie molecolari antiossidanti, a spostare l'equilibrio in senso ossidativo e ad indurre una risposta volta a potenziare la barriera antiossidante e a ristabilire l'omeostasi. A livello endocellulare il glutatione, con il suo gruppo tiolico capace di cedere e accettare elettroni, è uno dei principali attori della risposta ai radicali liberi. L'azione combinata degli enzimi glutatione-sintetasi (GS) e glutatione-riduttasi (GR) è di cruciale importanza per garantirne la disponibilità. Entro certi limiti, il GSSG prodotto per azione dei ROS dopo un insulto ossidativo ritorna a GSH per prevalente azione della GR. Poiché l'eccesso di GSSG è dannoso per la cellula in quanto ad elevate concentrazioni è in grado di modificare alcune proteine bersaglio alterandone la funzione

(meccanismo di glutationilazione), sulle membrane cellulari esiste un sistema di emergenza ATP-dipendente in grado di trasportare il GSSG in eccesso nello spazio extracellulare dove viene metabolizzato dalla gamma-glutamyl transferasi (19-21). Nei casi in cui si verifica una persistente ed elevata produzione di ROS, come durante l'esercizio fisico ad alta intensità, la continua deplezione di GSSG rende concreto il rischio di una diminuzione del GSH endocellulare e lo sbilanciamento dell'omeostasi in senso ossidante e suggerisce la necessità di interventi di integrazione.

L'assunzione di integratori alimentari contenenti vitamine, probiotici ed antiossidanti è una pratica frequente nello sport agonistico e mira a prevenire l'incremento dei ROS che si verifica durante l'attività, ad accelerare il successivo recupero ed evitare danni ossidativi molecolari, cellulari e tissutali. Gli antiossidanti esogeni come i polifenoli e le vitamine (C ed E in particolare) influenzano l'omeostasi redox generando composti attivi a basso peso molecolare, come  $H_2O_2$  e  $H_2S$ , noti per la loro capacità di stimolare la difesa antiossidante endogena e promuovere la citoprotezione (22). Tale effetto sembra però realizzarsi soltanto a basse concentrazioni: oltre ad una determinata soglia, che dipende dal contesto biologico e dalle modalità con cui l'intervento si svolge, gli antiossidanti esogeni possono causare effetti dannosi interferendo con l'ormesi dell'esercizio fisico (23). Questa risposta bifasica all'azione pleiotropica degli antiossidanti può spiegare molti risultati contrastanti ottenuti dalla ricerca di base e applicata e dev'essere attentamente considerata.

Anche l'integrazione con antiossidanti analoghi o equivalenti agli endogeni, come ad esempio i donatori di gruppi tiolici glutatione, metionina, cisteina e taurina, non è priva di criticità ed è stata spesso causa di insuccessi per gli effetti collaterali riscontrati e per le difficoltà di ottenere un'integrazione endocellulare soddisfacente per quantità e stato di riduzione delle molecole somministrate (22). Più promettente si è invece dimostrato l'uso di molecole in grado di sostenere la produzione di antiossidanti endogeni, come ad esempio NAC. Riducendo la cistina, forma endogena prevalente della cisteina (Cys), NAC rifornisce la GS di questo amminoacido che rappresenta il fattore limitante per la reazione. Anche la somministrazione di NAC tuttavia, non è priva di problemi in quanto particolari circostanze possono causare effetti indesiderati. Uno studio *in vitro* ha dimostrato ad esempio, che solo in colture cellulari nel cui medium venivano aggiunte proteine del siero, cioè un pool di molecole antiossidanti con potenziale redox inferiore, NAC conservava la sua forma ridotta: in colture prive di siero invece, NAC si auto-ossidava e diveniva a sua volta un agente pro-ossidante. Tale effetto è stato successivamente dimostrato anche *in vivo* a livello degli alveoli polmonari sulle cui superfici il trattamento con NAC ad alta concentrazione, l'assenza di condizioni siero-simili e le elevate produzioni di ROS nelle malattie respiratorie generavano un ambiente pro-ossidante che ostacolava l'azione dei macrofagi (24).

La somministrazione di NAC ha lo scopo principale di contrastare la deplezione di GSH endocellulare e

prevenire il danno ossidativo aumentando i livelli di GSH e di GR post-esercizio (25). Il suo effetto sembra però limitato ai soli soggetti che prima dell'integrazione presentano insufficienti livelli di GSH endogeno mentre appare poco efficace o ininfluenza nelle persone in condizioni di equilibrio ossidativo con elevata barriera antiossidante (26). Nonostante non ci sia accordo sulle quantità e sui limiti massimi di somministrazione giornalieri (2 o 5 g), è opinione abbastanza condivisa che l'assunzione di 1-1,2 g di NAC per medi periodi (7-30 giorni) possa favorire la rimozione di ROS e RNS, la up-regolazione delle difese endogene antiossidanti, la rigenerazione e il rimodellamento post-esercizio del tessuto muscolare (26).

Nel gruppo di atlete in studio le concentrazioni di glutazione totale alla visita V0 erano ottimali e non sono aumentate dopo trattamento con NAC. Alla V1 erano invece cambiate le concentrazioni di GSH e GSSG, con significative diminuzioni del primo ed aumenti del secondo. Per GSH in particolare, l'analisi multivariata ha permesso di escludere un effetto diretto dovuto all'aumento dei carichi di lavoro. È possibile che quanto osservato sia il risultato della combinazione dei due effetti di NAC in precedenza descritti, quello di sostegno della neosintesi del glutatione da un lato e di molecola potenzialmente pro-ossidante dall'altro.

Studi recenti hanno descritto anche un altro meccanismo d'azione di NAC per il quale, oltre all'azione diretta di riduttore dei ponti disolfuro, di scavenger dei ROS e di precursore per la sintesi del glutatione, è in grado di produrre H<sub>2</sub>S ed altre specie molecolari solforate che sarebbero le vere responsabili delle azioni antiossidanti e citoprotettrici finora attribuite direttamente a NAC e a GSH (27). Mentre in condizioni di forte diminuzione delle riserve antiossidanti endogene l'integrazione con NAC avrebbe come principale effetto l'incremento della sintesi di glutatione, in condizioni di riserve normali alimenterebbe preferenzialmente la produzione di specie molecolari solforate che sono in grado di incrementare la protezione e la disponibilità dei gruppi tiolici ridotti delle proteine ma non la sintesi del glutatione. È quindi possibile che proprio questo meccanismo glutatione-indipendente sia alla base del significativo incremento dei tioli sierici osservato alla V1 nel gruppo di atlete (delta +18% e  $p < 0,05$ ). Il fatto che la barriera antiossidante totale (BAP) non sia aumentata tra V0 e V1 nonostante l'aumento dei tioli sierici richiede un'attenta valutazione in quanto l'attività fisica può rappresentare un fattore confondente. I ROS prodotti con il lavoro muscolare infatti, oltre ad innescare l'infiammazione e "consumare" barriera antiossidante, attivano la sintesi di enzimi antiossidanti allo scopo di ristabilire l'omeostasi (9). Quando il carico di lavoro rimane al di sotto della soglia individuale che separa il corretto allenamento (eu-training) dal sovra-allenamento (over-training) il ripristino dell'equilibrio ossidativo avviene in modo fisiologico. Tuttavia, un'adeguata integrazione con antiossidanti può risultare utile in quanto, oltre a sostenere la deplezione iniziale della barriera endogena, può favorire un ritorno più rapido all'equilibrio omeostatico. In questo studio abbiamo potuto effettivamente constatare che alla V1 la

consistenza della barriera antiossidante totale non era cambiata ma non è stato possibile escludere l'incidenza dell'aumento dei carichi di lavoro, né attribuire questo effetto alla sola integrazione o dimostrare se essa abbia potuto accelerare il ritorno all'equilibrio.

È interessante anche osservare come, al termine dell'intervento, lo stato infiammatorio non sia rimasto semplicemente inalterato ma si sia spostato nel senso di una maggiore capacità anti-infiammatoria, con aumenti di IL-10 e diminuzione dei rapporti IL-6/IL-10. Per quanto il ruolo diretto dell'integrazione anche in questo caso sia sembrato plausibile, non è stato possibile escludere l'incidenza dell'aumento dei carichi di lavoro né dimostrare se l'effetto sia dipeso dall'azione della sola NAC (26) o da una in particolare o dall'azione sinergica delle altre molecole antiossidanti esogene somministrate in associazione (curcuma, astaxantina, antocianine). Merita ricordare a tale proposito che per molte molecole che *in vitro* hanno evidenti effetti antiossidanti, il meccanismo di azione *in vivo* è spesso sconosciuto (28). La loro frequente scarsa bio-disponibilità infatti rende difficile pensare ad una azione antiossidante diretta e induce ad ipotizzare regolazioni più fini di tipo epigenetico esercitate direttamente sulle cellule dell'ospite o indirettamente su quelle del suo microbiota (29).

La diminuzione dell'irisina osservata al termine del periodo di integrazione è difficilmente interpretabile. Pur essendo questa miocina oggetto di grande interesse e molti studi, i suoi meccanismi d'azione sono ancora poco conosciuti (30-31). Oltre alla più nota capacità di indurre la trasformazione del tessuto adiposo da bianco a bruno, sembra che l'irisina possa svolgere anche funzioni anti-infiammatorie ed antiossidanti (32-34). Tuttavia le diminuzioni osservate alla V1 assieme a quelle di CK non sembravano evidenziare questo effetto, salvo ipotizzare un minor rilascio conseguente al miglioramento delle condizioni di equilibrio ossidativo e delle capacità anti-infiammatorie. L'analisi multivariata, in ogni caso, non ha confermato la significatività statistica di queste variazioni.

È noto che i marcatori di danno ossidativo sono analiti che possono aumentare nei liquidi biologici in conseguenza ad alterazioni infiammatorie, anche di basso grado, che sono al contempo causa ed effetto di alterazioni dell'equilibrio ossidativo. Per apprezzare variazioni di concentrazione spesso di ordine nanomolare si rendono indispensabili tecniche analitiche di elevata specificità e sensibilità come HPLC e LC-MS/MS che, oltre ad avere queste caratteristiche, offrono l'opportunità di determinare profili composti da più marcatori in una stessa corsa cromatografica. A seconda delle condizioni e delle finalità dello studio infatti, può essere utile valutare alterazioni ossidative a diversi livelli cellulari. Nelle atlete osservate, come del resto era atteso considerata la loro età e il loro stato di salute, tutti i marcatori analizzati presentavano valori compresi entro gli intervalli di riferimento. L'incremento della capacità anti-infiammatoria osservato in V1 è correlato con una diminuzione statisticamente significativa, sia nel siero che nelle urine, della 3-NT che è un marcatore di danno nitrosativo da RNS sulle proteine. Analoghe diminuzioni, univoche nelle due matrici ma non statisticamente

significative, sono state osservate anche per 8OHGua, marcatore di danno ossidativo da ROS sulle basi azotate puriniche nonché di efficienza del meccanismo BER (Base Excision Repair mechanism) di riparazione del DNA. Le variazioni di diTyr, marcatore di danno ossidativo da ROS sulle proteine, del nucleoside nativo non ossidato 2dG e di 8OHdG, marcatore di danno ossidativo da ROS sulle basi azotate puriniche e di efficienza del meccanismo NER (Nucleoside Excision Repair mechanism) sono risultate non univoche per siero e urine, non statisticamente né clinicamente significative. Nel suo insieme, il quadro di sostanziale normalità dei marcatori di danno ossidativo, pur suggerendo una tendenza alla diminuzione del danno cellulare dopo l'integrazione, non ha permesso di giungere a conclusioni utili come in precedenti studi nei quali le frazioni di lavoro ad alta intensità degli atleti erano più rilevanti (9,35).

Le misure di indice redox, glutazione e interleuchine IL-6 e IL-10 prima dell'integrazione hanno invece permesso di descrivere efficacemente il sostanziale equilibrio ossidativo-infiammatorio iniziale, che in assenza di motivazioni, non avrebbe suggerito necessità di intervento. Gli stessi analiti si sono dimostrati utili anche per valutare a posteriori gli effetti del trattamento antiossidante, deciso in via preliminare per contrastare il previsto stress che sarebbe derivato dall'incremento del carico di lavoro. Il mantenimento dell'equilibrio ossidativo e l'aumento della capacità anti-infiammatoria conseguiti al trattamento sembrano averne indicato l'efficacia. Purtroppo, i limiti imposti dalla mancanza di un gruppo di controllo, che è una condizione sempre difficile da rispettare negli studi riguardanti atleti d'élite, hanno impedito di attribuire al solo trattamento gli effetti osservati. L'attento controllo nutrizionale e le limitate variazioni ponderali e dello stato di idratazione delle atlete fanno ritenere poco probabile che l'alimentazione possa avere condizionato i risultati (36). L'analisi multivariata invece ha permesso di escludere solo per GSH la possibile incidenza dell'attività fisica, inevitabilmente diversa per i diversi ruoli in squadra delle atlete, che potrebbe avere avuto un effetto confondente.

È infine importante sottolineare che, per affrontare studi in cui si utilizzano i biomarcatori del quadro ossidativo-infiammatorio, molti dei quali sono presenti in tracce e sono caratterizzati da un'elevata variabilità biologica, l'automazione dei processi e il ricorso a metodi ad alta sensibilità e specificità sono a nostro avviso indispensabili per limitare l'errore e per evitare di giungere a conclusioni fuorvianti.

## CONCLUSIONI

L'integrazione con antiossidanti nello sport dev'essere una scelta ponderata e fondata sulla preventiva valutazione delle reali necessità dell'atleta. Per questo motivo, il ruolo del laboratorio è cruciale in quanto permette di valutare le condizioni iniziali dell'equilibrio ossidativo, di scegliere in base a queste l'eventuale strategia di integrazione e di valutare successivamente gli effetti ottenuti, evitando azioni inutili o dannose. L'impiego di tecniche analitiche di elevata affidabilità

è indispensabile per poter apprezzare anche minime variazioni dei marcatori che compongono il delicato quadro dell'equilibrio ossidativo ed infiammatorio.

Sebbene solo per alcuni marcatori siano state osservate variazioni significative, i dati emersi dallo studio tendono ad evidenziare che, dopo l'integrazione la capacità anti-infiammatoria è aumentata e l'equilibrio ossidativo omeostatico è stato conservato, nonostante l'incremento dei carichi di lavoro delle atlete. Anche se le indicazioni riportate in letteratura riguardanti l'azione di NAC rendono plausibile attribuire all'integrazione gli effetti osservati, la mancanza di un gruppo di controllo non ha però consentito di escludere del tutto il possibile condizionamento dei risultati dovuto alla variazione dei carichi di lavoro. Tuttavia, il mantenimento dell'equilibrio ossidativo e la prevenzione di reazioni pro-ossidanti, che sono pregiudiziali indispensabili per evitare la vanificazione dell'effetto ormetico dell'allenamento, hanno suggerito l'adeguatezza dell'intervento antiossidante attuato.

## RINGRAZIAMENTI

Gli Autori ringraziano il prof. Rocco Micciolo dell'Università degli Studi di Trento per la revisione statistica, il dott. Francesco Ravasini di AVD Reform per la gentile donazione degli integratori utilizzati nello studio e la società Football Club Internazionale Milano per il supporto tecnico e logistico fornito.

## CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno

## BIBLIOGRAFIA

1. Steinbacher P, Eckl P. Impact of oxidative stress on exercising skeletal muscle. *Biomolecules* 2015;5:356-77.
2. Sachdev S, Davies KJA. Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise. *Free Radic Biol Med* 2008;44:215-23.
3. Gomez-Cabrera MC, Domenech E, Viña J. Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radic Biol Med* 2008;44:126-31.
4. Cheng AJ, Jude B, Lanner JT. Intramuscular mechanisms of overtraining. *Redox Biol* 2020;35:101480.
5. Radak Z, Zhao Z, Koltai E, Ohno H, Atalay M. Oxygen consumption and usage during physical exercise: the balance between oxidative stress and ROS-dependent adaptive signaling. *Antioxid Redox Signal* 2013;18:1208-46.
6. Li S, Fasipe B, Laherc I. Potential harms of supplementation with high doses of antioxidants in athletes. *J Exerc Sci Fit* 2022;20:269-75.
7. Pittaluga M, Parisi P, Sabatini S, Ceci R, Caporossi D, Valeria Catani M, et al. Cellular and biochemical parameters of exercise-induced oxidative stress: relationship with training levels. *Free Radical Res* 2006;40:6:607-14.
8. Le Moal E, Groussard C, Paillard T, Chaory K, Le Bris R, Plantet K, et al. Redox status of professional soccer players is influenced by training load throughout a season. *Int J Sports Med* 2016;37:680-6.
9. Bolner A, Berizzi C, Benedetto S, Vano R, Micciolo R, Muscarà A, et al. Marked differences in redox status of professional soccer players depending on training types. *Am J Res Med*

- Sci 2019;6:8-20.
- Zhang H, Forman HJ. Glutathione synthesis and its role in redox signalling. *Semin Cell Dev Biol* 2012;23:722-8.
  - Peternelj TT, Coombes JS. Antioxidant supplementation during exercise training: beneficial or detrimental? *Sports Med* 2011;41:1043-69.
  - Brooks GA. Lactate as a fulcrum of metabolism. *Redox Biol* 2020;35:101454.
  - Minuz P, Velo G, Violi F, Ferro A. Are nutraceuticals the modern panacea? From myth to science. *Br J Clin Pharmacol* 2017;83:5-7.
  - Margaritelis NV, Paschalis V, Theodorou AA, Kyparos A, Nikolaidis MG. Antioxidants in personalized nutrition and exercise. *Adv Nutr* 2018;9:813-23.
  - Paganini-Hill A, Kawas CH, Corrada MM. Antioxidant vitamin intake and mortality. *Am J Epidemiol* 2014;181:120-6.
  - Fernández-Lázaro D, Domínguez-Ortega C, Busto N, Santamaría-Peláez M, Roche E, Gutiérrez-Abejón E, et al. Influence of N-acetylcysteine supplementation on physical performance and laboratory biomarkers in adult males: a systematic review of controlled trials. *Nutrients* 2023;15:2463.
  - Carobene A, Sabetta E, Monteverde E, Spina A, Locatelli M. Intra-subject biological variation and reference change value data made available to clinicians: a step toward the interpretation of patient test results. *Biochim Clin* 2021;45:427-32.
  - Aarsand AK, Fernandez-Calle P, Webster C, Coskun A, Gonzales-Lao E, Diaz-Garzon J, et al. The EFLM Biological Variation Database. <https://biologicalvariation.eu/> (16.09.2023) (ultimo accesso: dicembre 2023).
  - Prchal J, Srivastava SK, Beutler E. Active transport of GSSG from reconstituted erythrocyte ghosts. *Blood* 1975;46:111-17.
  - Kondo T, Dale GL, Beutler E. Glutathione transport by inside-out vesicles from human erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci* 1980;77:6359-62.
  - Ballatori N, Krance SM, Marchan R, Hammond CL. Plasma membrane glutathione transporters and their roles in cell physiology and pathophysiology. *Mol Aspects Med* 2009;30:13-28.
  - McLeay Y, Stannard S, Houltham S, Starck C. Dietary thiols in exercise: oxidative stress defence, exercise performance, and adaptation. *J Int Soc Sports Nutr* 2017;14:12.
  - Tyuryaeva I, Lyublinskaya O. Expected and unexpected effects of pharmacological antioxidants. *Int J Mol Sci* 2023;24:9303.
  - Chan ED, Riches DWH, White CW. Redox paradox: effect of N-acetylcysteine and serum on oxidation reduction-sensitive mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;24:627-32.
  - De Moraes AdJP, Andreato LV, Branco BHM, da Silva EL, Gonçalves MA, Dos Santos RZ et al. Effects of N-acetylcysteine supplementation on cellular damage and oxidative stress indicators in volleyball athletes. *J Exerc Rehabil* 2018;14: 802-9.
  - Devrim-Lanpir A, Hill L, Knechtle B. How N-acetylcysteine supplementation affects redox regulation, especially at mitohormesis and sarcohormesis level: current perspective. *Antioxidants* 2021;10:153.
  - Pedre B, Barayeu U, Ezerina D, et al. The mechanism of action of N-acetylcysteine (NAC): the emerging role of H<sub>2</sub>S and sulfane sulfur species. *Pharmacol Ther* 2021;228:107916.
  - Fratta Pasini AM, Cominacini L. Effect of antioxidant therapy on oxidative stress in vivo. *Antioxidants* 2021;10:344.
  - Bolner A, Bertoldi L, Benvenuto G, Dick TP. Effects of dietary supplementation with fermented papaya on oxidative stress, symptoms, and microbiome in Parkinson's disease. *FFHD* 2023;13:191-205.
  - de Sousa CAZ, Sierra APR, Martínez Galán BS, Maciel JFS, Manoel R, Barbeiro HV, et al. Time course and role of exercise-induced cytokines in muscle damage and repair after a marathon race. *Front Physiol* 2021;12:752144.
  - Mazur-Bialy AI, Pocheć E, Zarawski M. Anti-inflammatory properties of irisin, mediator of physical activity are connected with TLR4/MyD88 signaling pathway activation. *Int J Mol Sci* 2017;18:701.
  - Giordano C, Amodei R, Di Stefano C. Il muscolo come organo endocrino: focus su irisina. *L'Endocrinologo* 2022;23:579-86.
  - Ren W, Xu Z, Pan S, Ma Y, Li H, Wu F, et al. Irisin and ALCAT1 mediated aerobic exercise-alleviated oxidative stress and apoptosis in skeletal muscle of mice with myocardial infarction. *Free Radic Biol Med* 2022;193:526-37.
  - Mazur-Bialy AI, Kozłowska K, Pocheć E, Bilski J, Brzozowski T. Myokine irisin-induced protection against oxidative stress in vitro. Involvement of heme oxygenase-1 and antioxidantizing enzymes superoxide dismutase-2 and glutathione peroxidase. *J Physiol Pharmacol* 2018;69:117-25.
  - Bolner A, Berizzi C, Corradini G. Vantaggi dei marcatori di ox-infiammazione nella valutazione dello stato di allenamento negli sport ad alta intensità: dati preliminari. *Biochimica Clinica* 2023;47:46-55.
  - Hillman AR, Vince RV, Taylor L, McNaughton L, Mitchell N, Siegler J. Exercise-induced dehydration with and without environmental heat stress results in increased oxidative stress. *Appl Physiol Nutr Metab* 2011;36:698-706.