



UNIVERZITET U NIŠU
MEDICINSKI FAKULTET



Vjeroslava G. Slavić

**Glikogen fosforilaza tip bb i hit šok protein 27 –
indikatori miokardnog stresa kod vaterpolista**

Doktorska disertacija

Niš, 2013



UNIVERSITY OF NIS
MEDICAL FACULTY



Vjeroslava G. Slavić

**Glycogen phosphorylase type bb and heat shock
protein 27 – indicators of myocardial stress in
water polo players**

Ph.D. Thesis

Nis, 2013

Komisija za ocjenu i odbranu doktorske teze:

Prof. dr Borislav Kamenov, Univerzitet u Nišu- Medicinski fakultet, mentor

Prof. dr Stevan Ilić, Univerzitet u Nišu-Medicinski fakultet, predsjednik

Prof. dr Dragan Radovanović, Univerzitet u Nišu-Fakultet sporta i fizičkog vaspitanja, član

Prof. dr Goran Nikolić, Univerzitet Crne Gore - Medicinski fakultet, počasni član

Datum odbrane: _____

Mojim najdražim: Ani, Vuku, Jeli, Gruju i Vladimiru

Najveću zahvalnost u nastajanju ovog istraživanja dugujem *Prof. dr Borislavu Kamenovu* na stručnoj podršci i savjetima iskrenog prijatelja bez koga ovo istraživanje ne bi bilo ovo što danas jeste.

Zahvaljujem *Prof. dr Stevanu Iliću* na velikom broju korisnih savjeta kojima je oplemenio ovaj rad.

Zahvaljujem *Prof. dr Draganu Radovanoviću* što je prihvatio da bude dio ovog rada.

Zahvaljujem se *Prof. dr Goranu Nikoliću*, dekanu Medicinskog fakulteta u Podgorici, što je sa zadovoljstvom prihvatio da učestvuje u finalizaciji ovog rada.

Zahvaljujem se *dr Ernestu Kapetanoviću* iz firme Diagenics sa sjedištem u Esenu, koji je vjerovao u mene i sponzoriseo ovo istraživanje.

Veliko hvala mom bratu što je omogućio da ovaj rad postane stvarnost.

Hvala mom prijatelju *dr Ivanu Lakićeviću* koji je "glavni krivac" za odabir sportista.

Hvala mojim saradnicima iz Instituta "Dr Simo Milošević": *Branki, Arijani, Mladeni, Vesni, Dariji i Cmilji*, na saradnji u realizaciji rezultata ovog istraživanja.

Zahvaljujem se molekularnom biologu *Ljiljani Branković* iz Niša na saradnji i satima rada u laboratoriji Dečije Interne klinike u Nišu.

Hvala mojoj direktorici *dr Marini Delić* na dijeljenju entuzijazma rezultata ovog istraživanja.

Posebno se zahvaljujem vaterpolistima VK "Jadran" iz Herceg Novog, juniorskim vicešampionima Evrope, što su pristali da budu aktivni učesnici ovog istraživanja.

Glikogen fosforilaza tip bb i hit šok protein 27-indikatori miokardnog stresa kod vaterpolista

Rezime

Uvod: Poslednjih godina svjedoci smo brojnih iznenadnih srčanih smrti među vrhunskim sportistima. Rizik za miokardijalna oštećenja kod dugotrajnih vježbanja je predmet brojnih debata jer su objavljeni rezultati u kojima je vježbanje dovelo do porasta koncentracija srčanih biomarkera kod elitnih sportista ali i kod ljudi koji su se rekreativno bavili sportom. Iako su rađene brojne studije nejasno je da li porast ovih markera kod zdravih sportista predstavlja klinički značajna srčana oštećenja ili je dio fiziološkog odgovora na dugotrajno vježbanje.

Glikogen fosforilaza tip bb (GP-BB) se izdvojio kao enzim sa visokom specifičnošću za ćelije miokarda i visokom senzitivnošću za kliničku dijagnozu rane miokardijalne ishemije. GP-BB je glikolitički enzim koji je odgovoran za mobilizaciju glukoze iz intraćelijskih depoa glikogena u uslovima ishemije čime se nadoknađuje "glad" tkiva za energijom. U procesima glikogenolize GP-BB se prevodi u solubilnu, monomernu citoplazmatsku strukturu sa posledičnim stvaranjem koncentracijskog gradijenta koji je neophodan za oslobađanje enzima u cirkulaciju. S obzirom da se radi o metabolički aktivnom enzimu za njegovo oslobađanje iz srčanih ćelija nije neophodno postojanje ćelijske smrti i/ili nekroze.

Proteini toplotnog šoka (eng. Heat shock proteins-Hsp) su evolutivno konzervirane proteinske strukture kojima pripadaju značajne uloge u praćenju i/ili nadgledanju procesa sinteze strukturalnih i funkcionalnih ćelijskih proteina. Prisutni su u svim humanim ćelijama i čine 5 do 10% od ukupnog intraćelijskog sadržaja proteina. Nakon izlaganja ćelije stresoru, sadržaj im se povećava na 15%. Hsp27 je odgovoran za stabilizaciju citoskeletnih proteina i za inhibiciju procesa apoptoze. Ekspresija i sinteza Hsp27 prolazno se povećava kao odgovor na djelovanje stresora, a po prestanku djelovanja stresa njegova koncentracija se naglo vraća na bazalnu vrednost, što ga čini veoma senzitivnim pokazateljem akutnih događanja na ćelijskom nivou. Poslednjih godina brojnim studijama *in vitro* i *in vivo* je potvrđeno da ima snažan protektivni efekat kod ishemijskih oštećenja ćelija miokarda.

Cilj istraživanja je bio da se ispita značaj GP-BB i Hsp27 kao senzitivnih i specifičnih markera za procjenu ranog miokardnog stresa kod vaterpolista.

Materijali i metode: Ispitivanje predstavlja prospektivnu i eksperimentalnu studiju kojom je obuhvaćeno 20 vaterpolo igrača muškog pola koji su metodom slučajnog odabira podijeljeni u

dvije grupe koje međusobno odgovaraju po polu, godinama starosti, dužini aktivnog bavljenja vaterpolom i nivou utreniranosti: (1) grupa koja je izložena fizički napornom treningu izdržljivosti (eksperimentalna grupa; n=10), (2) grupa koja nije trenirala (kontrolna grupa; n=10). Materijal za ispitivanje su uzorci krvi, 5 ml venske krvi koji su uzorkovani sledećim redosledom: prije treninga, 1, 30 i 60 minuta nakon treninga. Kao kontrole, koristili smo uzorke krvi uzete u istim vremenskim intervalima. Koncentracije GP-BB i Hsp27 su određivane primjenom imunisorbentnog testa povezanog sa enzimima (sandwich ELISA) korišćenjem komercijalnih kvantitativnih testova (Diagenics, USA za GP-BB, Calbiochem, USA za Hsp27). Intenzitet boje je očitavan na 450 nm na spektrofotometru (Microplate Manager Bio-Rad Laboratories, Inc).

Dobijeni rezultati su statistički obrađeni primjenom statističkog programa za Windows, verzija 17.0 (Statistical Package for Social Science-SPSS Inc., IL, USA). Statistički značajnim razlikama smatrane se vrijednosti $p < 0.05$ i $p < 0.001$.

Rezultati: Serumske koncentracije GP-BB prije treninga/bazalno su bile u granicama referentnih vrijednosti kod svih vaterpolista. Nakon treninga povišene koncentracije GP-BB je imalo 40% ispitanika nakon prvog i tridesetog i 10% nakon šesdesetog minuta. U kontrolnoj grupi vaterpolista koncentracije enzima nisu bile izmjenjene, ali je uočena određena dinamika u vremenskim intervalima i značajna razlika u serumskim koncentracijama između analiziranih grupa vaterpolista zapažena samo u posljednjem vremenskom intervalu ($p < 0.025$). Kod svih ispitivanih vaterpolista serumske koncentracije Hsp27 prije treninga/bazalno su bile povišene. Međutim, nakon treninga povišene koncentracije Hsp27 su zapažene kod 50% vaterpolista nakon prvog, 60% nakon tridesetog i 80% nakon šesdesetog minuta. U kontrolnoj grupi vaterpolista povišene koncentracije su otkrivene kod 30% ispitanika nakon prvog, 70% nakon tridesetog i 20% nakon šesdesetog minuta. U analiziranim vremenskim intervalima nije bilo značajnih razlika u koncentracijama Hsp27 između grupa. Serumske koncentracije GP-BB i Hsp27 su značajno pozitivno korelirale nakon prvog ($p < 0.05$) i tridesetog minuta ($p < 0.01$).

Zaključak: Porast serumskih koncentracija GP-BB kod vaterpolista uzrokovane naporom ukazuju na postojanje metaboličkog iscrpljivanja ćelija miokarda koje je reverzibilnog karaktera. Ono je praćeno i povećanom proteolitičkom aktivnošću u ovim ćelijama kroz opadanje serumskih koncentracija Hsp27 posle napora. Oštećenja proteinskih struktura u ćelijama miokarda, strukturnih i funkcionalnih, su reverzibilna jer su serumske koncentracije GP-BB i Hsp27

značajno korelirale u prvom i tridesetom minutu nakon napora. Naši rezultati upućuju da bi GP-BB i Hsp27 mogli da budu značajni indikatori u procjeni rizika i prevenciji nastajanja srčanih oštećenja kod vaterpolista, ali i kod sportista uopšte.

Ključne riječi: glikogen fosforilaza, hit šok protein 27, napor, miokardni stres, vaterpolo

Naučna oblast – Klinička imunologija- funkcionalno testiranje

UDK broj: 616-072.7

Glycogen phosphorylase type bb and heat shock protein 27- indicators of myocardial stress in water polo players

Summary

Introduction: In recent years, there is an evidence of many sudden cardiac deaths among elite athletes. The risk of myocardial damage in long-term exercise has been much debated because it has been reported that exercise increased serum concentration of cardiac biomarkers in elite athletes but also in people who were involved in recreational sports. Although numerous studies have been performed, it is still unclear whether the increase in these markers in healthy athletes is clinically significant or is a part of the physiological response to prolonged exercise.

Glycogen phosphorylase type bb (GP-BB) is segregated as an enzyme with high specificity to myocardial cells and high sensitivity for clinical diagnosis of early myocardial ischemia. GP-BB is a glycolytic enzyme responsible for the mobilization of intracellular glucose from glycogen depots under conditions of ischemia to compensate “hunger” tissue for energy. In the process of glycogenolysis, GP-BB is converted to soluble, monomeric cytoplasmatic structure with consequent creation of a concentration gradient that is necessary for the release of protein in the blood. Since it is a metabolically active enzyme, its release from cardiac cells does not require a cell death and/or necrosis.

Heat shock proteins (Hsp) are evolutionarily conserved protein structures with an important role in monitoring and/or supervising of the process of synthesis of structural and functional cellular proteins. They are present in all human cells and make 5 to 10% of total intracellular protein content. After cell exposure to stressor, their content increases to 15%. Hsp27 is responsible for cytoprotective processes which inhibit apoptosis. The expression and synthesis of Hsp27 transiently increase in response to stressor and upon the cessation of stress its concentration rapidly returns to baseline value, which makes it a very sensitive indicator of acute events at the cellular level. In recent years, numerous *in vitro* and *in vivo* studies have confirmed a strong protective effect of Hsp27 on ischemic myocardial cell damage.

The aim of this study was to determine an importance of GP-BB and Hsp27 as sensitive and specific markers for the assessment of early myocardial stress in water polo players.

Materials and Methods: A prospective and experimental study included 20 male water polo players, randomly divided into two groups that matched for gender, age, length of active

practicing water polo and level of physical stamina: (1) group exposed to a strenuous exercise training (experimental group, n = 10), (2) group that was not trained (control group, n = 10).

Blood samples for testing were obtained at the following time points: baseline, 1, 30 and 60 minutes following the exercise. The control blood samples were obtained at equivalent time-points. The concentrations of GP-BB and Hsp27 were determined by immunosorbent tests associated with enzymes (sandwich ELISA) using commercial quantitative kits (Diagenics, USA for GP-BB, Calbiochem, USA for Hsp27). The color intensity was read at 450 nm on the spectrophotometer (Microplate Manager Bio-Rad Laboratories, Inc.).

The results were statistically analyzed using the statistical package for Windows, version 17.0 (Statistical Package for Social Science-SPSS Inc., IL, USA). Statistically significant differences were considered as the values of $p < 0.05$ and $p < 0.001$.

Results: Serum concentrations of GP-BB before training/basal were within the normal range in all water polo players. After training, higher concentrations of GP-BB occurred in 40% of subjects after the first and thirtieth and 10% after the sixtieth minute. In the control group, the concentrations of this enzyme were unchanged, but there were a certain dynamic in the time intervals and significant difference in serum concentrations between the groups of water polo players only at the last time point ($p < 0.025$). Serum levels of Hsp27 were elevated in all water polo players before training/baseline. However, after training increased concentrations of Hsp27 were observed in 50% water polo players after the first, 60% after the thirtieth and 80% after the sixtieth minute. In the control group of water polo players, higher concentrations were detected in 30% of the subjects after the first, 70% after the thirtieth and 20% after the sixtieth minute. At the observed time intervals, there were no significant differences in the concentrations of Hsp27 between the groups. Serum concentrations of GP-BB and Hsp27 were significantly positively correlated after the first ($p < 0.05$) and thirtieth minutes ($p < 0.01$).

Conclusion: The increase in serum concentrations of GP-BB in water polo players by strenuous training point to the existence of metabolic exhaustion of myocardial cells which is reversible. It is accompanied by an increased proteolytic activity in these cells through a decrease in serum concentrations of Hsp27 after exertion. Damage of the protein structure in the myocardial cells, structural and functional, is reversible because the serum concentrations of GP-BB and Hsp27 were significantly correlated in the first and thirtieth minutes after effort. Our results suggest that

the GP-BB and Hsp27 could be important indicators of the risk assessment and prevention of developing heart damage in water polo players, but with athletes at all.

Key words: Glycogen phosphorylase, heat shock protein 27, effort, myocardial stress, water polo

Scientific field- Clinical immunology-functional testing

UDC number: 616-072.7

SADRŽAJ:

I PREGLED LITERATURE.....	14
<i>Uvod</i>	14
<i>Iznenadna srčana smrt sportista</i>	15
<i>Klasifikacija sporta</i>	17
<i>Trijažni programi za prevenciju ISS sportista</i>	18
<i>Mehanizmi ishemijskog oštećenja kardiomiocita</i>	20
<i>Faktori oslobađanja markera iz ćelija miokarda</i>	22
<i>Putanja kretanja srčanih proteina od srca do plazme</i>	22
<i>Srčani proteini kao rani markeri ishemije i/ili nekroze</i>	23
<i>Glikogen fosforilaza: struktura i funkcija</i>	24
<i>Glikogen fosforilaza tip bb</i>	25
<i>Biohemijske karakteristike</i>	25
<i>Kliničke karakteristike</i>	27
<i>Hit šok proteini (Heat shock proteins)</i>	29
<i>Klase Hsp-a</i>	30
<i>Klasa malih Hsp-a</i>	33
<i>Hsp27-struktura i funkcija</i>	34
<i>Hsp27-potencijalne kliničke primjene</i>	35
<i>Hsp27 i kardiovaskularni sistem</i>	36
II HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA	38
III PREDMET I CILJ ISTRAŽIVANJA	39
IV MATERIJALI I METODE.....	40
VI DISKUSIJA	57
<i>Antropološke karakteristike vaterpolista</i>	57
<i>Parametri kardiovaskularnog sistema kod vaterpolista</i>	58
<i>Frekvencija srčanog rada i krvni pritisak u vaterpolista</i>	60
<i>Ehokardiografske osobenosti kod vaterpolista</i>	60
<i>Varijacije broja leukocita uzrokovane naporom</i>	62
<i>Varijacije serumskih koncentracija magnezijuma indukovanih naporom</i>	65
<i>Varijacije serumskih koncentracija glikogen fosforilaze tip BB (GP-BB) uzrokovane naporom</i>	67

<i>Varijacije serumskih koncentracija Hsp27</i>	71
<i>Korelacije GP-BB sa kardiovaskularnim parametrima</i>	74
<i>Korelacije GP-BB sa serumskim koncentracijama Mg</i>	75
<i>Korelacije GP-BB sa Hsp27</i>	75
VII ZAKLJUČAK:	77
VIII LITERATURA.....	78
BIOGRAFIJA AUTORA.....	107
IZJAVE AUTORA	108

I PREGLED LITERATURE

Uvod

Dinamika savremenog načina života ispunjena je djelovanjem čitavog spektra negativnih uticaja na zdravlje pojedinca. Spoznaja o dominaciji neaktivnog načina življenja uz dokaze o pozitivnom uticaju fizičke aktivnosti i vježbanja na očuvanje i unapređenje zdravlja, kao na zdravstveno-preventivni potencijal fizičke aktivnosti, potakle su mnoge zemlje da u svoje zdravstvene programe prevencije i brige o poboljšanju zdravlja uključe i fizičku aktivnost [1]. Gotovo svakodnevno imamo priliku da pročitamo neku dobro argumentovanu studiju u kojima se sedentarni način života povezuje sa niskom funkcionalnom sposobnošću organizma ali i sa povećanom učestalošću hroničnih bolesti. Opšte prihvaćen stav je da određen stepen fizičke aktivnosti je važan u prevenciji faktora rizika za razvoj kardiovaskularnih oboljenja (KVS) u čijoj osnovi je aterosklerotski proces kao što su: gojaznost, hiperlipidemije, blage arterijske hipertenzije, insulin nezavisni diabetes mellitus. Takođe, fizički aktivan način života povezan je sa manjom učestalošću razvoja nekih zloćudnih bolesti (karcinom debelog crijeva, rak dojke kod žena), ali i u očuvanju koštane gustine tokom starenja [2].

Poslednjih godina se mnogo govori i piše o iznenadnoj srčanoj smrti (ISS) koja sve više pogađa populaciju mladih i aktivnih ljudi. U SAD svake godine se dogodi između 300 000 i 400 000 ISS [3]. U populaciji mladih ljudi (od 1 do 30 godina) učestalost ISS se procjenjuje na 1.3 do 8.5 na 100 000 godišnje, uz predominaciju muškog pola. Po tim podacima svake godine iznenada umire nekoliko hiljada Amerikanaca mladih od 20 godina, što je zabrinjavajući podatak [4]. U našoj zemlji nema sistematizovanih podataka o incidenci ISS, ali se zasigurno može reći da je ona i kod nas veliki problem pa joj se u poslednje vrijeme posvećuje velika pažnja.

Neosporna je povezanost fizičke aktivnosti i benefita na zdravlje pojedinca, ali bavljenje nekim vidom fizičke aktivnosti sa sobom nosi i određene rizike. Najozbiljniji među njima je ISS koja je češća pri fizičkim opterećenjima kod ljudi koji su skloniji sedentarnom načinu života u odnosu na populaciju ljudi iste dobi koji se redovno izlažu velikim fizičkim naporima [5]. U populaciji fizički neaktivnih pojedinaca relativni rizik za ISS pri povećanoj fizičkoj aktivnosti u poređenju sa drugim aktivnostima i mirovanjem iznosio je 56 (95% interval povjerenja se kretao

od 23-131), dok taj rizik kod sportista pada na 5 (95% interval povjerenja od 2 do 14) ali još uvijek postoji [6] i objašnjava se neotkrivenim srčanim oboljenjima, a ne fizičkim opterećenjem [7].

Iznenadna srčana smrt sportista

ISS može zadesiti i sportiste, i to kako one koji se rekreativno bave sportom tako i one vrhunske. To je na neki način kuriozitet obzirom na opšte prihvaćeno mišljenje da su sportisti fizički sposobni i zdravi ljudi, a bavljenje sportom aktivnost korisna po zdravlje ljudi. Imajući u vidu da su sportisti osobe takmičarskog duha, željne sportskog dokazivanja, a posledično sklone minimiziranju tegoba i disimilaciji, kao i nepridržavanja ljekarskim savjetima o veličini trenažnih opterećenja naročito u periodu rekonvalescencije, to i nije neko iznenađenje. Intenzivni treninzi uzrokuju velike funkcionalne i anatomske promjene u organizmu, neke su kratkoročne (tokom treninga), a druge su dugoročne (poslije više godina treniranja). Neke od ovih promjena su korisne po zdravlje, za neke je to diskutabilno, dok se za neke pouzdano zna da nisu korisne. Sve gore navedeno uz nedovoljnu zdravstvenu kontrolu sportista kako u predselekciji tako i u kasnijem toku treninga i takmičenja je dovoljan razlog za zabrinutost [8,9].

Prije gotovo pola vijeka je počela da se obraća pažnja na ovakve događaje u sportu, a prve ozbiljnije studije počele su da se objavljuju dvadesetak godina kasnije. To su uglavnom bili opisi pojedinačnih slučajeva iznenadnih smrti sportista koje su se dešavale na takmičenjima i tokom treniranja. Takvi događaji su ranije bili češći nego danas obzirom da je zdravstvena kontrola sportista bila nerazvijenija nego danas, a sport mnogo manje materijalizovan te je bilo mnogo manje interesa i novca za adekvatnu opremu i kadrove [10].

Iznenadna smrt mladih sportista je već dugo poznat entitet. Smrt grčkog vojnika Fidipidesa 490 godine prije nove ere nakon pretrčane distance od Maratona do Atine da bi prenio vijest o pobjedi grčke vojske nad Persijom, smatra se prvim zapisanim slučajem iznenadne smrti sportista. I kasnije, naročito posljednjih dvadesetak godina, smrt svakog poznatog sportiste, osvajača olimpijske medalje kao i vrhunskih takmičara privlačila je veliki publicitet i pokretala velike diskusije o uzrocima i prevenciji iznenadne smrti kod sportista. Spomenuću samo neke od najpoznatijih sportista iznenadno umrlih tokom takmičenja, treninga ili neposredno nakon: odbojkašica Flo Hyman 1986. godine, košarkaši Hank Gathers 1990. godine i Reggie Lewis 1993.godine, klizač Sergej Grinkov, fudbaleri Vladimir Dimitrijević 2001.godine i Marc Vivien Foe 2003.godine i maratonke Anne Loyley 1989. na Londonskom polumaratonu [11,10].

Učestalost iznenadne smrti kod sportista u velikoj mjeri varira od studije do studije. To je uglavnom posledica do sada nesistematizovanih podataka dobijenih iz obdukcioničkih nalaza, a studije su uglavnom bile retrospektivne. Po njima ona je iznosila 25 na 100 000 sportista, iz KVS razloga je nešto manja, iznosi 15 do 20 na 100 000, odnosno oboljenja srca su bila uzrok kod 60 do 80% slučajeva [7]. U populaciji mlađih sportista (do 35 godine starosti) ISS se povezuje sa kongenitalnim KVS bolestima (pr. kardiomiopatija, aritmogena displazija desne komore, anomalije koronarnih krvnih sudova, dr) dok u populaciji starijih sportista (stariji od 35 godina) glavni uzrok je ateroskleroza koronarnih arterija u čak 80% slučajeva [1]. Najčešći uzroci ISS kod sportista u formi poređenja dvije velike studije, Američke i Italijanske grupe su prikazani u tabeli 1. [12,13]

Tabela 1. Komparativni prikaz najčešćih uzroka ISS u Američkoj i Italijanskoj studiji

Klinički entiteti	SAD registar	Italijanska studija
Hipertrofična kardiomiopatija	36%	2%
Anomalije koronarnih arterija	17%	12%
Miokarditis	6%	6%
Kardiomiopatija desne komore	4%	22%
Prolaps mitralnog zaliska	4%	10%
Aortna stenoza	3%	
Sužene koronarne arterije	3%	
Koronarna ateroskleroza	3%	18%
Jonske kanalopatije	3%	
Idiopatska dilatativna kardiomiopatija	2%	
Ruptura aortne aneurizme	2%	
Druga kongenitalna oboljenja srca	2%	

SAD registar je obuhvatio 1435 mladih sportista koji se aktivno takmiče [12], dok je Italijanska studija rađena na mladim sportistima (12 do 35 godina) uključenih u takmičarski sport u poređenju sa nesportskom populaciji iste dobi [13].

ISS najčešće se javlja u populaciji sportista od 20 do 30 godina starosti, odnosno najviše su pogođeni aktivni sportisti. Međutim, kod sportista koji su uključeni u takmičarski sport relativni rizik za ISS je 2.8 puta povećan u odnosu na one sportiste koji se ne takmiče [13].

Imajući u vidu sve gore navedeno nameće se jedno pitanje: da li sportska aktivnost uzrokuje ISS mladih ljudi [14]?

Incidenca ISS u vaterpolo sportu je još manja, ali je takođe priznato da za vaterpolo sport za sada nema sistematizovanih izvještaja. ISS vaterpolista su sporadično prijavljivani uglavnom za starije sportiste koji su završili sportsku karijeru. Smatra se da bi intenzitet vježbanja mogao da bude glavni faktor koji utiče na njenu incidencu [15].

Klasifikacija sporta

Sportovi su klasifikovani kako bi se pokušalo odgovoriti na osnovno pitanje: da li je dovoljno bezbjedno preporučiti da se sportisti sa određenim KVS anomalijama bave takmičarskim sportom [16]? Procjena KVS oboljenja kod sportista je neprecizna i može da se promijeni vremenom pod uticajem fizičkih treninga, te je posljedica sinkopa značajna komponenta u klasifikaciji sportova uz intenzitet vježbanja i sklonost ka povređivanju.

Sportovi se međusobno razlikuju na osnovu zastupljenosti i intenziteta statičkih i dinamičkih vježbi, kao i sredine u kojoj se izvodi (pr. smanjena je količina kiseonika ispod vode kod vodenih sportova). U modernim naučnim pristupima pripremni treninzi za sportska takmičenja su mnogo zahtjevniji za KVS nego samo takmičenje [16].

Dugotrajno vježbanje dovodi do pokretanja čitavog niza adaptacionih mehanizama organizma u cjelini, a za nas posebno interesantna je adaptacija KVS sistema. Hronična adaptacija KVS sistema na dinamičke vježbe je povećanje maksimalne potrošnje kiseonika, dok je kod statičkog vježbanja ima malo ili nema uticaja na potrošnju kiseonika [17]. S aspekta aerobnosti/anaerobnosti, statičke vježbe visokog intenziteta su anaerobne, dok su dinamičke vježbe visokog intenziteta aerobne [16].

Klasifikacija prikazana u figuri 1. je zasnovana na postizanju maksimuma u statičkim i dinamičkim komponentama u takmičenjima, uz nezaobilaznu konstataciju da se veće vrijednosti postižu na treninzima. Povećanje dinamičkih komponentni je prikazano kao procenat maksimalne potrošnje kisonika ($\max O_2$) i povećanja srčanog outputa. Povećanje statičke komponente je povezano sa postignutim procentom maksimalne voljne kontrakcije (MVK) i povećanjem opterećenja krvnog pritiska. Najmanje opterećenje je prikazano zelenom, a najveće crvenom bojom.

Figura 1. Klasifikacija sporta

III.visoka (>50% MVK)	bob bacanje/atletika jedriličarstvo sportsko penjanje, skijanje na vodi, dizanje tegova	bodi bilding, skijanje, skatebord, snowbord, rvanje	boks, kanu/kajak, biciklizam, desetboj/triatlon, veslanje, brzo klizanje
	streljaštvo, auto trke, ronjenje, jahački sport, motociklizam	američki fudbal, skokovi/atletika umjetničko klizanje sprint/atletika surfanje, sinhrono plivanje	košarka, vaterpolo hokej na ledu, nordijsko skijanje, trčanje (srednje pruge) plivanje, rukomet
	bilijar, kuglanje, kriket, karling, golf	bejzbol, mačevanje, stoni tenis, odbojka	badminton, hokej na travi, brzo hodanje, trčanje (duge pruge), fudbal, tenis
	A.niska (<40% maxO ₂)	B.umjerena (40-70% maxO ₂)	C.visoka (>70% maxO ₂)

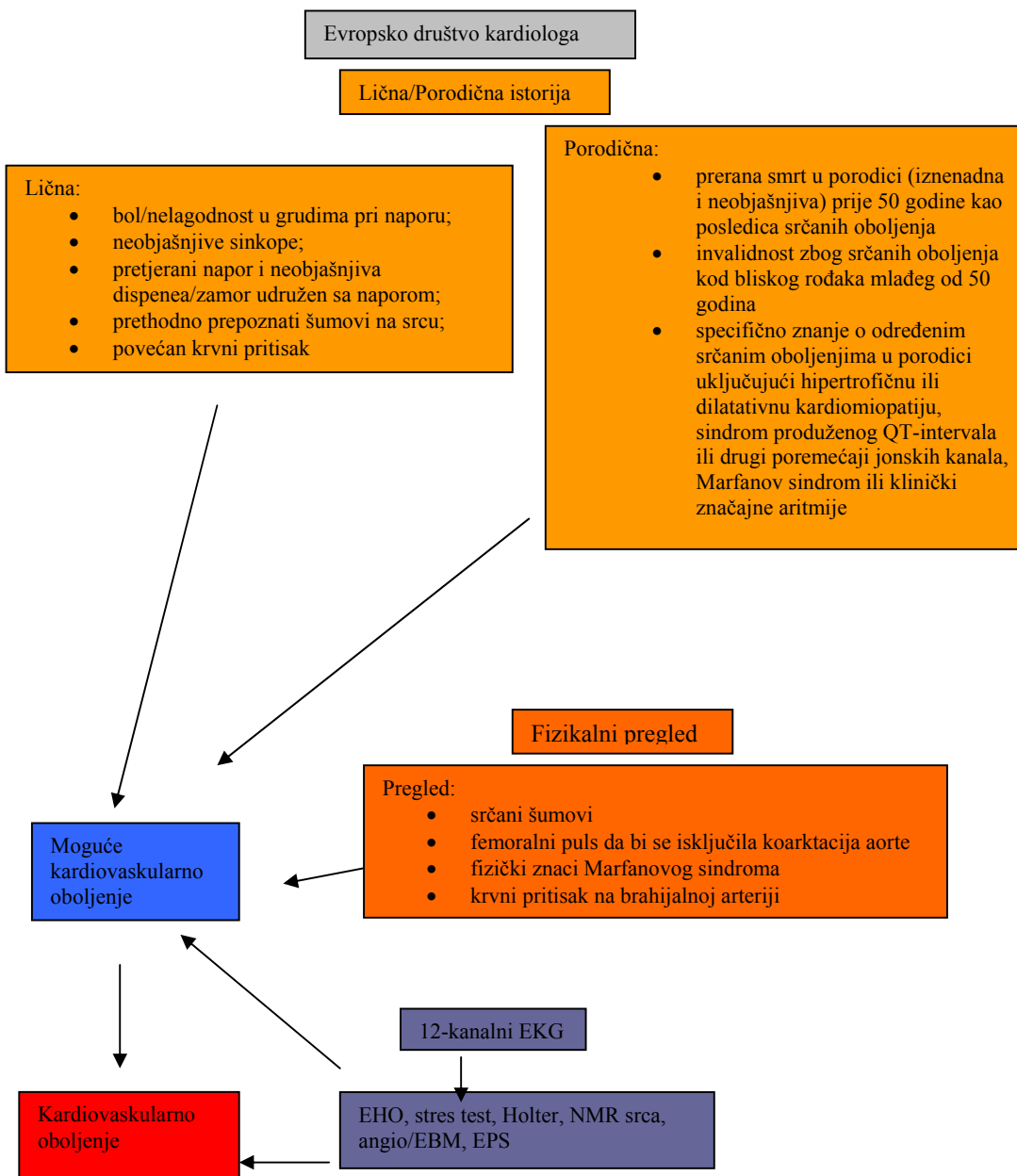
Na osnovu ove klasifikacije vaterpolo sport spada u grupu sportova koji se definišu kao visoko dinamični i sa umjereno-visokim intenzitetom statičkih komponenti vježbanja [15].

Trijažni programi za prevenciju ISS sportista

KVS uzročnici smrti među sportistima vrlo često se inicijalno prezentuju smrću pojedinca, a sama dijagnoza se postavlja na autopsijama. Nesretna činjenica da je postmortalna dijagnoza pravilo prije nego izuzetak, predstavlja teško breme za sportsko-medicinsku zajednicu. I ako je ekstremno teško identifikovati pojedince kod kojih postoji rizik od ISS, taj čin je od neprocjenjive važnosti [1]. U cilju izbjegavanja tragičnih smrti među sportistima kao djelotvorna

mjera opreza preporučuje se medicinska procjena prije započinjanja glavnih programa treninga. Nažalost ovakvi pregledi su ograničeni, nestalni ili nepostojeći. Glavni cilj jeste identifikacija ili postavljanje sumnje za okultno KVS oboljenje koje može da bude uzrok ISS, nefatalnog infarkta miokarda, moždanog udara, angine, akutnog koronarnog sindroma ili srčane insuficijencije kao posljedica intenzivne sportske aktivnosti ili naglog napora [18]. Naravno ovakvi trijažni programi i njihovi ciljevi se razlikuju u odnosu na nacionalno porijeklo ili kulturu. Evropsko društvo kardiologa (European Society for Cardiology-ESC) predložilo je smjernice za pretakmičarsku trijažu sportista [19] koji se razlikuje od preporuka Američkih kardiologa (American Heart Association-AHA) [18]. Osnovna razlika ove dvije preporuke jeste u činjenici da je 12-kanalni EKG obavezna rutina i standardni dijagnostički test za otkrivanje mogućih poremećaja sprovođenja i srčanog ritma prema ESC, a po AHA 12-kanalni EKG nije obavezan [19,18]. Trijažne programe treba da sprovode zdravstveni radnici, posebno obučeni medicinskim vještinama za prepoznavanje srčanih oboljenja po Evropskim preporukama, dok u SAD-u to sprovode licencirani ljekari [15].

Figura 2. Skrining program sportista za prevenciju iznenadne srčane smrti prema ESC [19]



Mehanizmi ishemijskog oštećenja kardiomiocita

ISS mladih ljudi i sportista je nažalost postala stvarnost, ali i motivacija naučnika za bolje razumijevanje patofizioloških mehanizama oštećenja ćelija miokarda. Među brojnim mehanizmima oštećenja ćelija miokarda za nas od posebnog značaja je ishemija, stanje u kome koronarni krvotok ne obezbjeđuje dovoljno kiseonika za metaboličke potrebe srčanog mišića. Kiseonik koji je prisutan u kapilarima kao *oksihemoglobin* i u kardiomiocitima kao

oksimoglobin se iscrpljuju za nekoliko sekundi, dok su energetske depoi u ćelijama miokarda jako mali [20]. Primjera radi, u srčanim ćelijama psa rezerve su takve da mogu da obezbijede tri ili četiri efikasne kontrakcije srca [21]. Smatra se da se kratak period ishemije, oko 15 minuta, može tolerisati i da se ćelije mogu oporaviti [20].

Ishemične promjene na ćelijama miokarda počinju za nekoliko sekundi od početka prekidanja aerobnog i prelaskom na anaerobni metabolizam uz mobilizaciju rezervi glikogena u ćelijama u procesu označenom kao „anaerobna glikoliza“ koji ne obezbjeđuje dovoljno energije. Već nakon 1 do 2 minuta dolazi do usporavanja anaerobne glikolize i tako usporena perzistira unutar jednog sata nakon čega se zaustavlja. Među produktima metaboličkih procesa u anaerobnim uslovima u ćelijama se veoma brzo nakupljaju osmotski aktivne partikule čime nastaje značajan osmotski pritisak koji je odgovoran za ulazak vode u ćelije i narušavanje jonske homeostaze [20].

Oštećenja ćelija miokarda uzrokovana ishemijom na početku su reverzibilnog karaktera, uz povećanu propustljivost ćelijske membrane, ali sa očuvanim integritetom. Ukoliko se ishemija nastavlja duže od nekoliko sati nastaje narušavanje integriteta ćelijske membrane što se smatra „tačkom bez povratka“ nakon čega se razvijaju znaci nekroze sa gubljenjem ćelijskih jedara i raslojavanjem kardiomiocita [20].

Otvoreno je pitanje da li je oslobađanje intramiokardijalnih proteina uvijek indikator nekroze miokarda? Zahvaljujući boljem razumijevanju patofizioloških i biohemijskih procesa u ćelijama miokarda prihvaćeno je da je fiziološka nepropustljivost sarkoleme pod kontrolom metaboličkih procesa u samoj ćeliji, te se manja količina ekstracelularnih miokardnih proteina može smatrati pratećim fenomenom reverzibilnih metaboličkih oštećenja. U blažim formama ishemijskog stresa može da se oslobađa manja količina makromolekula iz djelova citoplazme mehaničkim putem što se razlikuje od oslobađanja u uslovima stalno narušenog integriteta sarkoleme [22,23,24]. U *in vitro* uslovima na kulturi kardiomiocita adultnih pacova je dokazano da se citoplazmatski enzimi mogu oslobađati u medijum kod reverzibilnih oštećenja. Ovi procesi su direktno ili indirektno zavisni od potrošnje energije jer se oslobađaju iz ćelija u stanjima energetskog deficita [22]. U *in vivo* uslovima okluzija koronarnih arterija u trajanju od 15 minuta na modelu psa ili majmuna dovodi do oslobađanja kreatin-kinaze (CK) i glikogen fosforilaze (GP) bez razvoja histoloških znakova nekroze ćelija u zahvaćenom dijelu miokarda [24,25]. Ramppis sa saradnicima je ukazao da značajno oslobađanje CK, laktat dehidrogenaze (LDH) i

troponina T (TnT) nastaje nakon 20 minuta ishemije pri čemu mitohondrijalna membrana ostaje intaktna, a povremeno se mogu u njima naći gusta tjelašca velike elektronske gustine [26].

Bez obzira na ove rezultate mnogi istraživači vjeruju da trenutne histološke ili radiološke tehnike nisu dovoljno senzitivne da potvrde ćelijsku nekrozu kada je ona tačkasta (krpičasta) i zahvata mali broj ćelija. Manje kontraverzno i opšte prihvaćeno jeste da pojava mitohondrijalnih enzima (mitohondrijalni CK ili glutamat dehidrogenaze) u serumu i prolongirana povećana kontraktinost (duže od dva dana) sa pojavom regulatornih proteina u serumu ukazuju na nekrozu miokarda [20].

Faktori oslobađanja markera iz ćelija miokarda

Rano oslobađanje markera je pod uticajem velikog broja različitih faktora među kojima su se izdvojili:

1. *intraćelijska lokalizacija markera* - za oslobađanje citoplazmatskih proteina neophodna je propusna ćelijska membrana, dok je oslobađanje strukturnih proteina komplikovanije i uz povećanu ćelijsku permeabilnost neophodni su i procesi disocijacije i degradacije na subćelijskom nivou čime je proces njihovog oslobađanja usporen.
2. *molekulska težina ili masa* - markeri male molekulske težine brže dopijevaju u cirkulaciju direktno preko mikrovaskularnog endotela te im je i koncentracija u cirkulaciji značajno veća, dok teži molekuli sporije dopijevaju u cirkulaciju.
3. *postojanje koncentracijskog gradijenta* između ćelijske membrane i intersticijuma utiče na brže dopijevanje markera u cirkulaciju.
4. *metabolizam markera u organizmu* - većina markera se razgrađuju u organima sa visokim metaboličkim indeksom (pr. jetra, pankreas, bubrezi i ćelije retikulo-endotelne sistema) što značajno utiče na brzinu njihove eliminacije iz krvi [20].

Putanja kretanja srčanih proteina od srca do plazme

Prema dosadašnjim saznanjima svi solubilni proteinski markeri miokarda se pojavljuju u intersticijalnim strukturama istovremeno nezavisno od njihove molekulske težine u uslovima povećane permeabilnosti sarkoleme. Međusobno se razlikuju na osnovu brzine dopijevanja iz intersticijuma u cirkulaciju. Nekoliko studija je pokazalo da oko 80% proteina iz intersticijalnih prostora miokarda dopijeva u cirkulaciju direktno preko mikrocirkulacije [27,28,29]. Srčano tkivo se karakteriše gustom kapilarnom mrežom i sa visokom kapilarnom permeabilnošću što

kao rezultantu ima veliko područje za direktan ulazak u mikrocirkulaciju procesima proste difuzije ili pinocitoze. Endotelne ćelije u krvnim sudovima srca su razdvojene malim intercelularnim pukotinama i molekuli male molekulske težine ulaze u cirkulaciju kroz te „maloporne transportne sisteme“. Tu je i veliki broj pinocitotičnih vezikula u samim endotelnim ćelijama označene kao „veliko-porni sistem“ koji su odgovorni za transkapilarni transport molekula velike molekulske težine, kao što su proteini. Oba sistema su u velikoj mjeri zastupljena u zidovima venskih kapilara koji su također zahvaćeni ishemijom [30]. Ovo su mehanizmi koji značajno ubrzavaju direktni ulazak proteina u kapilare uz stimulaciju protoka limfe. Manji molekuli difunduju mnogo brže te u cirkulaciji mogu da budu prisutni u značajno većim koncentracijama u odnosu na veće molekule. Preostalih 20% proteina se transportuju putem limfe. Imajući u vidu kontraktilnost srčanog mišića ovaj transport je relativno brz, proteini i enzimi za oko 20 minuta dopijevaju iz srca u centralni venski sistem [28], te i na ovaj način manji dio proteina brzo dopijevaju u plazmu.

Srčani proteini kao rani markeri ishemije i/ili nekroze

Pronalaženje sofisticiranog biohemijskog markera postalo je sve važnije za istraživanje oštećenja miokarda. Prošlo je 50 godina od otkrića prvih enzimskih markera koji su bili od pomoći u potvrđivanju postojanja nekroze miokarda [31]. U dugogodišnjem radu istraživača i kliničara izazovi su bili tkivna specifičnost i klinička senzitivnost. Tkivna specifičnost je zahtijevala postojanje visoke koncentracije biomarkera u srčanom mišiću uz relativno niske koncentracije u drugim tkivima, kao i dobro poznavanja njegove tkivne distribucije u patološkim i fiziološkim stanjima [32]. Nakon brzine dopijevanja u krv za kliničare krucijalno je postojanje korelacija njegovih serumskih koncentracija sa veličinom nastalog oštećenja i kliničkom prognozom [33].

U toku poslednjih 50-tak godina bilo je značajnog napretka po pitanju tkivne specifičnosti biomarkera, kao i njihove kliničke senzitivnosti i specifičnosti. Danas oni igraju značajnu ulogu u otkrivanju oboljenja, faktora rizika i za terapijski monitoring [32]. Dobar biohemijski test mora da bude senzitivan, specifičan i da obezbjeđuje brzo dobijanje rezultata u klinički korisnom vremenskom intervalu [34]. U kardiologiji posebno se akcentuje brzina dobijanja rezultata te se dobrim testom smatra onaj za čije dobijanje rezultata je potrebno manje od 1 sata od uzorkovanja krvi [35]. Poslednjih godina istraživački naponi su usmjereni u pravcu identifikacije markera za kliničku dijagnozu ishemije miokarda unutar 1 do 3 sata od početka

prekordijalnog bola. Izdvojilo se nekoliko alternativnih markera: albumin modifikovan ishemijom (eng. Ischemia modified albumin-IMA) [36], srčani protein koji vezuje masne kisjeline (FABP-H) [37] i glikogen fosforilaza tip BB (GP-BB) [38].

Glikogen fosforilaza: struktura i funkcija

Glikogen fosforilaza (GP) (1,4 α -D-glukan: ortofosfat α -D-glukoziltransferaza, E.C. 2.4.1.1.) je enzim kome pripada centralna uloga u procesima mobilizacije ugljenih hidrata iz njihovih ćelijskih i tkivnih depoa [39]. Smatra se arhitipom kontrolnog proteina čija je aktivnost regulisana procesima reverzibilne fosforilacije i alosternim vezivanjem efektornih molekula, koji se danas smatraju nezaobilaznim intraćelijskim kontrolnim mehanizmima metabolizma, rasta, kontrole ćelijskog ciklusa, hormonskog odgovora, procesima učenja i pamćenja [40,41,42].

Fiziološka uloga enzima je u katalizaciji prvog koraka u ćelijskoj glikogenolizi kada se glikogen prevodi u glukozo-1-fosfat korišćenjem neorganskog fosfora [43]. Monomer GP je veliki protein sastavljen od 842 amino kisjeline sa molekulskom težinom od 97 434 kDa. U humanim ćelijama može da bude prisutan u formi neaktivnih monomera ili tetramera, a biološki aktivna forma je dimer sastavljen od dva identična monomera [44].

Svaki monomer je sastavljen od dva domena: (1) *C-terminalni domen* koji je odgovoran za katalitičke reakcije i (2) *N-terminalni domen* kome pripada regulatorna uloga u funkciji enzima. Odnosno C-terminalni domen je dio molekula za koji se kovalentno vezuje koenzim piridoksal fosfat, a na N-terminalnom domenu se nalaze Serin 14 koji je značajan za procese fosforilacije, mjesta vezivanja AMP/ATP, mjesta vezivanja za glikogene strukture kao i kontaktni region koji je odgovoran za konformacione promjene monomera za stvaranje aktivne dimerne strukture ovog enzima [45].

Tercijalna proteinska struktura enzima je prilagođena njegovim funkcionalnim zahtjevima. Predstavljena je jezgrom koje je izgrađeno od β -listova koji su okruženi α -spiralnim segmentima. C-terminalni domen je jedinstvena tercijarna struktura, dok je N-terminalni domen podijeljen na dva subdomena u funkcionalnom smislu [46].

U humanim tkivima postoje tri izoforme ovog enzima koje su dobile nazive prema tkivima u kojima su predominantno ekspimirani: BB (moždana), LL (jetrena) i MM (mišićna) [47,48,49,50,51,52,53,54,55,56]. One pokazuju visok stepen konzervacije na N terminalnom u odnosu na C terminalni region [57,58,59], ali i izostanak homologije u poređenju sa primitivnim

organizmima [58]. Međutim, humani izoenzimi GP pokazuju određen stepen homologije u proteinskim sekvencama (BB-LL 80%; BB-MM 83%) [39].

Analiza humanog genoma je ukazala da su tri različita cDNA za GP lokalizovani na različitim hromozomima odnosno da su geni rasuti po genomu [39]. Geni za sintezu LL i MM izoenzima su locirani na 11 i 14 hromozomu, dok je BB izoenzim kodiran genima koji se nalaze na 20 ali i na 9, 10, 11 i 12 hromozomu [58] što ukazuje na postojanje dvije identične kopije ovog izoenzima kodiranog odvojenim hromozomima [39].

Obzirom da se radi o enzimskim strukturama koje su konstitutivno prisutni u humanim ćelijama razlikuju se inaktivne i aktivne forme enzima. U stanju mirovanja ćelije enzim GP je prisutan kao inaktivna forma označena kao *b forma* koja u skladu sa ćelijskim potrebama prelazi u aktivnu označenu kao *a forma* [41,42]. Aktivacija može da bude dvojaka: (1) alosterno vezivanje efektornih molekula kojim ćelija odgovara na koncentracije intraćelijskih metabolita kao što su: AMP/IMP, glukoza-6-fosfata ili (2) reverzibilnom fosforilacijom serina na poziciji 14 kao odgovor na nervnu ili hormonsku stimulaciju [60,46,61,62,39,63,64]. Aktivacijom ćelija aktivnost enzima se povećava u opsegu od 40 do 60%, što je značajno manje u odnosu na druge degradacione enzime, što ukazuje da je povećana potrošnja enzima praćena manjom ali značajnom sintezom novih proteina [65].

Glikogen fosforilaza tip bb

Biohemijske karakteristike

Humani GP-BB pokazuje posebnu senzitivnost za nedostatak kiseonika u kardiomiocitima [66,67]. Ćelije centralnog nervnog sistema i miokarda su jedina tkiva sa značajnim sadržajem ovog enzima [59,68] i povećanje koncentracije GP-BB u uslovima intaktne hematoencefalne barijere se smatra visoko senzitivnim za ishemijska oštećenja miokarda [38].

Enzim GP-BB smješten je u sarkoplazmatskom retikulumu vezan za glikogen stvarajući makromolekularni kompleks označen kao sarkoplazmatski glikogenolitički kompleks [69,70], gdje katalizuje prvi korak glikogenolize. Fiziološka uloga enzima je u obezbjeđivanju potrebne energije za mišićne kontrakcije miokarda, naročito u anaerobnim uslovima. Stepenu udruženosti enzima sa ovim kompleksom određena je metaboličkim zahtjevima ćelija miokarda, što ga čini visoko senzitivnim na razlaganje glikogena u uslovima ishemije [70]. Logičan zaključak je da prolongirane mišićne kontrakcije rezultuju smanjenom udruženošću glikogena sa

sarkoplazmatskim retikulumom [72]. GP-BB u makromolekularnom kompleksu se nalazi u inaktivnoj ili *b formi* u više od 95% [73], a aktivacijom kompleksa prelazi u aktivnu ili *a formu* sa značajno manjim afinitetom vezivanja za sarkoplazmatski retikulum [72].

U stanjima ishemije miokarda aktivacija GP-BB u kardiomiocitima rezultira povećanom glikogenolizom, čime se nadoknađuje „glad“ tkiva za energijom, a GP-BB se usled visokog koncentracijskog gradijenta i povećane ćelijske permeabilnosti oslobađa u cirkulaciju [38]. Propustljivost ćelijske membrane kardiomiocita u stanjima teških ali reverzibilnih ishemija miokarda, simultano se mijenja tako da solubilni proteini mogu prostom difuzijom da izlaze iz ćelija i dospijevaju u cirkulaciju [22]. Aktivna forma GP-BB je relativno velike molekulske mase od 188 kDa u odnosu na druge biohemijske markere (17.8 kDa mioglobin, 37 kDa cTnT, 86 kDa CK) [38].

Razgradnja glikogena u ishemijskim stanjima u ćelijama kardiomiocita je dugo poznat proces ali još uvijek nije u potpunosti razumljiv. Publikovane su studije u kojima je ukazivano na moguće toksične efekte razlaganja glikogena u anaerobnim uslovima usled nakupljanja metabolički aktivnih vodonikovih jona i laktata odnosno na poželjno smanjivanje glikogenskih depoa prije ishemičnih epizoda [74]. Istovremeno publikovane su i studije kojima je potenciran protektivni efekat raspoloživih depoa glikogena u odnosu na ishemijska oštećenja miokarda [75,76]. Skorijim radovima je ukazano da je ćelijska homeostaza ishemijskih kardiomiocita očuvana dok je prisutan glikogen koji je dostupan za proizvodnju energije [77]. Prisustvo glikogena u ćelijama srca i njegov metabolizam dugo su privlačili pažnju u odnosu na srčanu funkciju i disfunkciju [78]. Srce je jedini organ koji nakuplja velike količine glikogena u fetalnom dobu [79].

Sarkoplazmatski glikogenolitički kompleks u cjelini odslikava intenzitet ishemijskih oštećenja ćelija miokarda. Sarkoplazmatski retikulum je ćelijska organela koja je izuzetno osjetljiva na ishemijska oštećenja [80]. Gubitak kontraktilnih sposobnosti nakon prolongirane ishemije korelira sa smanjenom aktivnošću sarkoplazmatskog retikuluma [81]. Rezerve glikogena u ćelijama miokarda u visokom stepenu su zavisne od načina ishrane te su razumljive i njegove varijacije među vrstama. Rezerve u humanima kardiomiocitima iznose 40 do 60 μ mola glikoznih jedinica po gramu suvog ostatka [82]. U stanjima ishemije i pojačanog srčanog rada koncentracije glikogena u ćelijama opadaju [83]. Smatra se da se depoi glikogena iscrpljuju za

15 do 30 minuta što zavisi od stepena ishemije ali i od preishemijskih rezervi glikogena u ćelijama [84].

Kliničke karakteristike

U poslednjih 10-tak godina urađeno je nekoliko kliničkih studija sa ciljem da se dokaže da je GP-BB pogodan kao specifičan marker rane faze akutnog koronarnog sindroma, odnosno rane ishemije miokarda. GP-BB se prvenstveno pokazao kao senzitivnan marker za dijagnozu akutnog infarkta miokarda (AIM) unutar prva četiri sata od početka bola u grudima. Ukazano je da kod većine pacijenata sa AIM njegova koncentracija je rasla između drugog i četvrtog sata od početka tegoba [38]. Vrh ili pik u koncentracijama je postizao u intervalu od šestog do dvadesetog sata nakon početka prekordijalnog bola, sa ranim pikom kod pacijenata sa ranom reperfuzijom u području zahvaćenih koronarki, a u referentne vrijednosti koncentracije su se vraćale nakon jednog do dva dana [84].

Na GP-BB je potom ukazano kao na senzitivni marker za procjenu rizika od nastajanje IM [38] obzirom da je prvi marker čija koncentracija se povećava kod pacijenata sa nestabilnom anginom pectoris (AP). GP-BB je ukazao na izuzetnu senzitivnost kod jednog pacijenta sa nestabilnom anginom pectoris kod koga je u nekoliko uzoraka krvi u toku 50 sati utvrđeno postojanje nekoliko skokova u koncentraciji GP-BB koji su odslikavali ponovljene epizode prekordijalnog bola. Ovo je bila potvrda da se GP-BB oslobađa u cirkulaciju odmah nakon ishemijskih oštećenja miokarda čak i pri postojanju minimalnih lezija miokarda, ali i da se vrlo brzo uklanja iz cirkulacije [83].

Komparacija srčanih markera je potom odrađena za utvrđivanje senzitivnosti u detekciji minimalnih oštećenja miokarda na uzorcima tkiva dobijenih endomiokardnom biopsijom [86]. U ovoj studiji nije došlo do porasta koncentracije GP-BB, ali su koncentracije TnT, mioglobina, CK-MB bile značajno povećane 10 minuta nakon dijagnostičke endomiokardijalne biopsije. U diskusiji objašnjavajući izostanak porasta koncentracije GP-BB autori su ukazali na činjenicu da pri izvođenju endomiokardijalne biopsije nisu isprovocirali ishemiju [86].

U kontekstu procjene rizika GP-BB se pokazao značajnim u praćenju ili monitoringu farmakološke ili mehaničke reperfuzione terapije. Uspješna reperfuzija rezultuje značajno ranijem oslobađanju GP-BB iz miokarda [38]. GP-BB senzitivnan marker u potvrđivanju perioperativne ishemije miokarda kod pacijenata podvrgnutih operaciji ugradnje koronarnog bajpas-a (CABG), u postoperativnom monitoringu, u procjeni rane reperfuzije, kao i za

dijagnozu ponovne ishemije kod pacijenata sa preležanim infarktom miokarda 12 sati nakon razvijanja infarkta, kao i da je pokazao mnogo veću senzitivnost u odnosu na CK-MB u procjeni oštećenja miokarda [84]. Dalje, dijagnostička specifičnost kod netraumatizovanih bolova u grudima je bila značajno veća u odnosu na CK-MB [38], što je ukazivalo da je GP-BB osjetljiv marker u detekciji ishemijskih oštećenja miokarda [86].

Upoređujući plazma koncentracije GP-BB sa zvaničnim srčanim markerima TnT, CK i mioglobinom u različitim vremenskim intervalima od početka prekordijalnog bola dobijeni rezultati su ukazali da je upravo GP-BB bio osjetljiv u ranoj fazi anginoznog bola, koja je do sada često bila nedijagnostifikovana. Odnosno, u prvom satu GP-BB je visoko senzitivnan (100%) i specifičan (96%) [87]

Tabela 2. Senzitivnost i specifičnost GP-BB u poređenju sa TnT, CK i mioglobinom (u procentima) [87]

<i>Vrijeme od početka simptoma</i>	<i>TnT</i>	<i>CK-MB</i>	<i>Mioglobin</i>	<i>GP-BB</i>
1 sat	72.7 (100.0)	90.9 (66.0)	90.8 (88.0)	100.0 (96.0)
2 sat	85.7 (100.0)	71.4 (96.0)	85.7 (94.0)	95.5 (96.0)
3 sat	95.5 (100.0)	81.8 (92.0)	90.5 (100.0)	100.0 (96.0)
4 sat	95.7 (100.0)	91.3 (96.0)	95.7 (90.0)	100.0 (94.0)
5 sat	95.1 (100.0)	87.8 (98.0)	90.2 (100.0)	97.7 (96.0)

Plazma koncentracija GP-BB je bila povećana u prva tri sata od početka bola u grudima kod 100% bolesnika. U prvih šest sati GP-BB je pokazao najveću senzitivnost i specifičnost u poređenju sa mioglobinom i CK-MB. TnT je pokazao visoku specifičnost i senzitivnost kasnije,

nakon trećeg sata. U bolesnika sa AP koncentracije GP-BB su značajno povećane u poređenju sa drugim markerima [87].

Interesantno je značajno povećanje koncentracija GP-BB kod pacijenata sa stresom indukovanim defektima u perfuziji, kao i da porast njegove koncentracija potkrijepljuje prisustvo ishemije miokarda [88].

GP-BB mogao bi biti od velike pomoći za procjenu rizika kod pacijenata sa hipertrofičnom kardiomiopatijom obzirom na njegovu udruženost sa pritiskom u plućnim arterijama i indeksom mase lijeve komore kod ovih pacijenata [89].

Predlaže se primjena GP-BB kao veoma senzitivnog markera za procjenu kardiotsičnosti hemioterapije. Objavljeno je nekoliko studija u kojima je potvrđen porast njegove koncentracije kod bolesnika koji su primali određene onkološke protokole za liječenje hematoloških malignih oboljenja (non-Hodgkin-ov limfoma i leukemija) uz izostanak porasta koncentracija drugih srčanih biomarkera (TnI, TnT, CK-MB) ukazujući na moguću primjenu GP-BB za detekciju subkliničke kardiotsičnosti onkoloških protokola [90,91].

Mogućnost primjene određivanja GP-BB je pronašla svoje mjesto i u pedijatriji. Ukazano je da on može biti senzitivan biomarker oštećenja miokarda kod neonatusa sa asfiksijom za potvrđivanje nastalog oštećenja miokarda ali i za procjenu težine nastalog oštećenja [92].

Hit šok proteini (Heat shock proteins)

Heat shock proteins (Hsp) ili proteini toplotnog šoka su visoko konzervirani proteini prisutni u svim ćelijama organizama, od jednostavnih prokariota do najkompleksnijih sisara, uključujući i čovjeka [93]. Sedamdesetih godina prošlog vijeka Ritosa je uočio da izlaganje toploti pljuvačnih žlijezda larve *Drosophila* indukuje aktivnost specifičnih gena u ovim ćelijama [94], a tako kodirani proteini označeni su kao „proteini toplotnog šoka“ (eng *heat shock proteins*) [95]. Nakon toga je uslijedilo interesovanje istraživača o značaju Hsp-a za funkcionisanje humanih ćelija, preko 29 000 referenci u pretraživanju PubMed baze podataka [96]. Danas govorimo da je sinteza Hsp-a uslovljena ne samo toplotom već i djelovanjem brojnih stresogena iz okoline, kao što su: oksidativni stres, nedovoljna ishrana, ultravioletna zračenja, hemikalije, virusi i ishemijsko-reperfuzione povrede. Pored ovakve indukovane ekspresije Hsp u stresogenim uslovima, u normalnim fiziološkim uslovima postoji i njihova konstitutivna ekspresija tkz „*low level expression*“ odnosno oni čine 5-10% ukupnog proteinskog sadržaja u uslovima zdravog ćelijskog rasta [97,98].

Hsp-i su evolutivno najkonzerviraniji ćelijski proteini i predstavljaju drevni, primarni sistem ćelijske „samoodbrane“ odnosno mehanizam očuvanja homeostaze organizma u cjelini. Sposobnost organizma da se uspješno adaptira ili aklimatizuje na novo okruženje ima kritičnu ulogu u njegovom preživljavanju i samim tim je integrisan u pravcu evolutivnog razvoja. Hsp-i se sintetišu u ćelijama pod normalnim, fiziološkim uslovima (*konstitutivni*), a njihova sinteza se značajno povećava nakon izlaganja metaboličkom stresu (*inducibilni*). U zavisnosti od lokacije, intra ili ekstra ćelijske, posjeduju dualizam u funkcionisanju. Intracelularni Hsp-i imaju ulogu „pratioca“ (eng *chaperons*) ili čuvara sinteze novih, funkcionalnih proteina kroz procese njihovog „umotavanja i/ili razmotavanja“ i u preveniranju nakupljanja nagomilanih ili nerastvorljivih proteina [99]. Hsp-i locirani ekstracelularno ili vezani za ćelijske membrane aktivno učestvuju u modulaciji i regulaciji imunskog odgovora, urođenog i stečenog, kroz mehanizme kontrole ćelijskih signala i procesa transporta proteina kroz intraćelijske membrane [100,101,102,103]. Posljednjih godina objavljuvani su radovi u kojima je pažnja usmjerena na uloge Hsp-a u patogenezi infektivnih, autoimunskih, kardiovaskularnih, onkoloških i neurodegenerativnih oboljenja. Obzirom na značajne uloge koje im pripadaju u patogenetskim mehanizmima pažnju privlače i kao potencijalni terapijski molekularni ciljevi u liječenju kancera, Alchajmerove i Parkinsonove bolesti ali i kao vakcine u liječenju infekcija i kancera [104,105,106,107].

Ćelijski stres narušava tercijalne strukture proteina i ima neželjene efekte na ćelijski metabolizam. Prethodno izlaganje ćelija stresu blagog intenziteta dovoljno je da indukuje ekspresiju Hsp-a sa posledičnom zaštitom od narednih inzulta. Ovaj fenomen se označava kao „tolerancija stresa“ i vjerovatno je posledica ponovnog rastvaranja proteina koji su bili denaturisani tokom inicijalnog stresa. Ćelijske strukture (mikrofilamenti i centrozomi) i ćelijske funkcije (transkripcija i translacija) su stabilnije tokom drugog izlaganja stresogenu kod ćelija kod kojih je postignuta tolerancija stresa. Imajući u vidu njihovu sveprisutnost i esencijalne uloge u produkciji, kontroli kvaliteta i raspolaganju drugim proteinima nije iznenađenje da su Hsp-i među najkonzerviranim genskim produktima u prirodi [107].

Klase Hsp-a

Hsp-i se klasifikuju na osnovu svoje molekulske težine koja varira od 10 do 150 kDa, ali i na osnovu funkcija u ćelijama. Većina funkcioniše kao molekuli koji prate procese vezivanja, stabilizacije, translokacije ili regulacije nestabilnih proteina (pr. sintetisanih, denaturisanih,

nepotpunih statusa receptora i slično) sa ciljem obezbjeđivanja njihove dalje sudbine [108]. U tabeli 3 date su klase Hsp-a, njihove lokacije u ćelijama kao i uloge, intra i/ili ekstracelularne.

Tabela 3. Klase Heat shock proteina

<i>Hsp klase ili proteini</i>	<i>Lokacija u ćeliji</i>	<i>Intracelularne uloge</i>	<i>Ekstracelularne uloge</i>
<u>Veliki Hsp</u>			
<i>Hsp110</i>	Citoplazma; jedro	Molekularni chaperon [109]	
<i>Hsp90</i> <i>Hsp90a inducibilni</i>	Citoplazma; jedro	Molekularni chaperon, funkcionišu kao steroidni- glikokortikoidni receptor [110], suzbija Hs faktora 1 [111]	
<i>Hsp90b</i>	Citoplazma; jedro	Isto kao i za Hsp90a Specifičan molekularni chaperon za endoplazmatski retikulum [112]	
<i>Grp94</i>	Endoplazmatski retikulum		
<i>Hsp70</i> <i>Hsp70/Hsp72</i> <i>Inducibilni</i>	Citoplazma; jedro	Molekularni pratioci [113], anti-inflamacija [114], anti-apoptoza [115]	Imunski odgovor [118], daljinska signalizacija [100]
		Molekularni chaperon [113]	

<i>Hsp73</i>	Citoplazma; jedro	Chaperon transporta mitohondrijalnih proteina [116]
<i>Hsp75</i>	Mitohondrije	Chaperon specifičan za endoplazmatski retikulum [112]
<i>Hsp78</i>	Endoplazmatski retikulum	
<i>Hsp60</i>	Mitohondrije; citoplazma	Konformacija proteina koji ulaze u mitohondrije, anti i pro apoptotično djelovanje [117], anti-inflamatorno [118]
<i>Hsp40</i>	Citoplazma; jedro	Co-chaperon Hsp70
<i>Hsp32</i> (hem oksigenaza)	Citoplazma	Antioksidans [119]
<u>Mali Hsp</u>		
<i>Hsp25/27</i>	Citoplazma; jedro	Molekulani chaperon, stabilizuje mikrofilamente ćelija [120], anti-apoptoza [117], anti-inflamatorno djelovanje [114]
<i>Hsp10</i>	Mitohondrije; citoplazma	Co-chaperon Hsp60
<i>α/β kristalin</i>	Citoplazma	Održavanje ćelijske mikrostrukture [120]

Imajući u vidu da je ovdje riječ o proteinskim strukturama posebnu pažnju istraživača su privlačili geni koji kodiraju njihovu sintezu. Broj gena uključenih u sintezu Hsp klasa pokazuju velike varijacije među vrstama (pr za sintezu Hsp70 uključena su 3 gena kod E.colli, a u humanim ćelijama 13 gena). Tokom evolucije u Hsp genima uočen je fenomen duplikacije čime se postižu potrebni, dodatni predstavnici u klasama Hsp za različite djelove ćelija, tkivnu specifičnost ili ekspresiju u toku rasta i razvoja. Fenomenom duplikacije gena obezbjeđuje neophodnu funkcionalnu različitost [121]. Identifikacija gena je u osnovi nomenklature koja je sistematizovala simbole Hsp gena od strane HUGO Gene Nomenclature Committee [122]. Prema ovoj nomenklaturi iz 2008.god. u sintezi različitih Hsp klasa je uključen različit broj gena: 4 za Hsp110, 5 za Hsp90, 13 za Hsp70, 9 za Hsp60, 50 za Hsp40 i 11 za male Hsp-e [122].

Klasa malih Hsp-a

Mali Hsp-i su konstitutivno eksprimirani u gotovo svim organizmima i posjeduju molekulsku masu od 12 do 43 kDa kao monomerne strukture. U ćelijama oni mogu da stvaraju oligomerne komplekse koji dostižu molekulsku težinu do 1MDa [124]. Monomerne strukture malih Hsp-a posjeduju određene strukturalne sličnosti [125]. Svi ovi proteini na C-terminalnom kraju posjeduju homolog i visoko konzerviran domen označen kao α -kristalin, sastavljen od 80 do 100 amino kiselina koji stvaraju β -nabore značajne za stvaranje stabilnih dimernih struktura. Homologija ovih domena varira od 20% između bakterija i sisara do 60% između različitih humanih tkiva [126]. Preostali dio C-terminalnog kraja je varijabilan i odgovoran za visok stepen mobilnosti i fleksibilnosti. N-terminalni kraj je građen od manje konzerviranog regiona označenog kao WD/EPF domen, koji pokazuje konzerviranost u neposrednoj blizini C-terminalnog kraja [127].

Primarna struktura α -kristalina je odgovorna za stvaranje stabilnih dimernih i tetramernih, ali i nestabilnih oligomernih struktura koji mogu da budu izgrađeni od 16 do 32 subjedinice [127]. Rezultati novijih studija su ukazali na postojanje ne samo homolognih, već i heterolognih oligomernih kompleksa koji su sastavljeni od različitih malih Hsp-a u živim humanim ćelijama. U literaturi su opisana tri ovakva kompleksa. Predpostavka je da u humanim tkivima postoji nekoliko različitih formi homo i hetero-oligomernih kompleksa sastavljenih od istih ili različitih malih Hsp-a [128].

Jedna od najvažnijih zajedničkih karakteristika predstavnika malih Hsp-a je njihova sposobnost oligomerizacije u velike intraćelijske agregate. U osnovi stvaranja ovih agregata jeste fosforilacija amino kiseline serin na različitim, jasno označenim molekularnim pozicijama. Fosforilacijom nastaje njihova aktivacija i brza translokacija iz jedra u citoplazmu gdje bivaju lokalizovani. Ovo je veoma kompleksan proces u koji su uključene različite protein kinaze na različitim mjestima kao odgovor na djelovanje različitih stimulusa izvana [129].

U tabeli 3 navedeni su predstavnici malih Hsp-a, njihove lokalizacije u ćelijama i intracelularne funkcije. Zajedničke funkcije predstavnika ove klase Hsp-a su: aktivni „pratioci i čuvari“ ćelijskih proteina, toleranca temperature, inhibicija apoptoze, regulacija ćelijskog razvoja i diferencijacije, a značajne su im uloge u signalnoj transdukciji [130].

Hsp27-struktura i funkcija

Hsp27 je predstavnik klase malih Hsp-a i identifikovan je kao protein koji posjeduje visok stepen homologije sa α -kristalinom iz oka [131]. Prisustvo Hsp27 je potvrđeno u mnogim humanim ćelijama, uglavnom u citoplazmi, ali i u perinuklearnim regionima, endoplazmatskom retikulumu i jedru. Konstitutivna ekspresija je potvrđena u nekoliko organa i tkiva: oko, nervni sistem, srce, krv i krvni sudovi, pluća, mokraćna bešika, debelo crijevo, želudac i estrogen zavisni organi. Smanjene koncentracije Hsp27 su detektovane u drugim tkivima, kao što su epitelijalne ćelije dojki, testisima i poprečno prugastoj muskulaturi [132].

U *in vivo* modelu Hsp27 je odgovoran za termotolerancu, dok je u *in vitro* modelu djelovao kao ATP-nezavisan molekularni pratilac kroz inhibiciju agregacije proteina i kroz stabilizaciju djelimično denaturisanih proteina. Značajno je uključen u inhibiciju apoptoze, a njegova interakcija sa aktinskim filamentima štiti ih od fragmentacije. Odgovorni su i za očuvanje fiksni, fokalnih kontakata na ćelijskim membranama [133]. Aktivacijom proteozoma Hsp27 ubrzavaju procese uklanjanja ireverzibilno denaturisanih proteina, a povećanom aktivacijom NF- κ B puteva kontroliše inflamaciju i procese ćelijskog rasta, razvoja i diferencijacije. Citoprotektivna svojstva Hsp27 su posledica njegove sposobnosti da moduliraju reaktivne kiseonične radikale i povećavaju koncentracije glutationa u ćelijama [134].

Obilježja funkcija Hsp27 značajnih za opstanak ćelija je praćeno strukturalnim promjenama molekula. U ćelijama stvaraju oligomerne strukture koji posjeduju naglašenu ulogu čuvara intraćelijskih proteina. Sastoje se od stabilnih dimera, izgrađenih od dva monomera koji su međusobno spojeni preko susjednih α -kristalinskih domena [127,135,136]. Oligomerizacija

Hsp27 u ćelijama je veoma dinamičan proces u kome postoji ravnoteža između stabilnih dimera ili tetramera i nestabilnih oligomera koji su građeni od 16 do 32 subjedinice i dostižu molekulska masu veću od 800 kDa [136,137,138]. Sama dinamika procesa je određena fiziologijom ćelija, fosforilacionim statusom Hsp27 i izloženosti stresu. Fosforilacioni status Hsp27 odnosno proces fosforilacije je najupadljivija promjena koja se smatra veoma značajnom za regulaciju strukture i funkcije [138], i smatra se jednim od najranijih događaja indukovanih stresom [129]. U Hsp27 postoje tri značajna fosforilaciona mjesta, serin-15, serin-78 i serin-82, pri čemu je prva pozicija odgovorna za konformacionalne promjene Hsp27, a druge dvije za disocijaciju velikih multimernih struktura [139,140].

U ćelijama Hsp27 je eksprimiran u formi homopolimera čija veličina varira od 2 do 24-mera u skladu sa njegovim fosforilacionim statusom. Ukoliko ćelija nije izložena nikakvom značajnijem stresu eksprimiran je kao nefosforilisani 24-meri homopolimer. Izlaganje ćelije stresu dovodi do njegove fosforilacije i disocijacije u dimerne strukture [139]. Povećana fosforilacija može da se detektuje nakon nekoliko minuta, dok se izmjenjena ekspresija detektuje tek nakon nekoliko sati [129]. Promjene oligomernih struktura Hsp27 mogu da budu dvojake, nastajanje ili većih ili manjih oligomera [141,142]. Oligomerizacioni status Hsp27 je udružen sa njegovom ulogom čuvara intraćelijskih proteina, pri čemu veliki oligomeri su snažni intraćelijski čuvari, dok dimeri ne posjeduju takve uloge [127].

Hsp27-potencijalne kliničke primjene

Povećano interesovanje kliničara za funkcionisanje sistema intraćelijskih Hsp-a i mogućnost njihove primjene uticao je na obilje dokaza o njihovim značajnim ulogama u patologiji brojnih oboljenja, kao što su Alzhajmerova bolest, prioni, amiloidoza, stvaranje katarakte, bolest srpastih ćelija, cistična fibroza i ishemija miokarda [143]. Kardioprotektivno djelovanje Hsp-a je priznato kao jedno od najvažnijih budućih pravaca u istraživanjima ishemijskih oboljenja srca [144]. Imajući u vidu da se broj oboljelih stalno povećava, terapijske intervencije u malom stepenu utiču na post-infarktne morbiditet i mortalitet, bolje razumijevanje mehanizama kardioprotektivnog djelovanja Hsp-a bi mogli značajno da utiču na ukupan klinički ishod. To obuhvata bolje upoznavanje sa njihovim ulogama u hroničnim stanjima, kao što su ateroskleroza, hipertenzija, diabetes, genetski poremećaji, valvularna oboljenja srca, koji konvergiraju kroz zajedničke puteve rezultujući srčanom insuficijencijom i iznenadnom smrću [143].

Hsp27 i kardiovaskularni sistem

Ishemija uzrokuje obimna oštećenja intracelularnih proteinskih struktura, naročito mikrotubularnih struktura koje se bogate aktinom, otokom i gubitkom mitrohondrija, dok su značajno manje dramatične promjene u proteinima ćelijske membrane i u morfologiji površine ćelija [145,146,147]. Nakon ishemijskog stresogenog djelovanja na ćelije opšta sinteza proteina je inhibirana, ali je značajno povećana translacija Hsp-a i njihov udio u intraćelijskim proteinima se povećava na 15 do 25% za samo nekoliko minuta [148,149]. Nekoliko studija je potvrdilo da kao odgovor na ishemijsku u kardiomiocitima dolazi do up-regulacije proteina stresa koji koreliraju sa povećanom enzimskom aktivnošću katalaza, ukazujući na potencijalne aditivne ili sinergističke interakcije ovih endogenih puteva i oksidativnog stresa [150,151].

Poslednjih godina pažnja je usmjerena na uloge i značaj Hsp27 u KVS oboljenjima obzirom na njegove uloge u čuvanju intracelularnih proteina, inhibiciji F-aktin polimerizacije, štiti od apoptoze kao i njegove aktivne uloge u prezentaciji oksidisanih proteina proteozomalnoj degradacionoj mašineriji [152]. Koncentracije Hsp27 u krvi veoma brzo se povećavaju kao odgovor na stresogeno djelovanje. Porast njegove koncentracije je tranzitnog karaktera i po prestanku stresogenog djelovanja veoma brzo se vraćaju na bazalne koncentracije [153].

U animalnom modelu miokarda psa je ukazano na postojanje različite ekspresije Hsp27 u uzorcima normalne, očuvane lijeve komore i insuficijentne lijeve komore [154]. Miševi sa povećanom ekspresijom Hsp27 su bili zaštićeni od letalnih ishemijsko/reperfuzionih oštećenja u poređenju sa miševima iz istog okota koji nisu imali njegovu povećanu ekspresiju [155]. Povećana ekspresija Hsp27 štiti kardiomiocite odraslih pacova od ishemijskih oštećenja [156]. Dokazano je da Hsp27 djeluje antiapoptotično na djelovanje doxorubicina, citostatika, koji može da uzrokuje dilatativnu kardiomiopatiju i kongestivnu srčanu insuficijenciju [157]. Takođe, ekspresija disforilisanih formi Hsp27 je bila prisutna u zdravim krvnim sudovima u poređenju sa alografnim kardijalnim vaskulopatijama kod pacijenata koji su bili podvrgnuti transplantaciji srca [158].

Istraživači poslednjih godina ukazuju na mogućnost primjene Hsp27 kao mogućeg biomarkera ateroskleroze obzirom da je dokazana smanjena koncentracija Hsp27 u arterosklerotičnim arterijama u poređenju sa zdravim arterijama [159]. Testirana je i mogućnost njegove primjene kao prognostičkog biomarkera KVS događanja u prospektivnoj studiji na zdravim ženama. Studija je trajala šest godina i dobijeni rezultati studije su ukazali da njegove

bazalne koncentracije nisu bile udružene sa učestalošću KVS incidenata [160]. Smanjivanje koncentracija Hsp27 ekstracelularno odlikava postojanje proteolitičke aktivnosti u patološki izmijenjenim zidovima arterija. Smanjivanje njegovih intracelularnih koncentracija korelira sa povećanom apoptozom vaskularnih glatkih mišića što je karakteristika nestabilnih plakova [161]. U eksperimentalnom modelu ateroskleroze je ukazano da povećana ekspresija Hsp27 redukuje progresiju lezije, što ukazuje na potencijalni terapijski cilj [162].

Hsp27 bi mogao da bude značajan marker miokardijalne ishemije, a njegovi kardioprotektivne efekti uglavnom su određeni ekstenzivnom fosforilacijom ovog proteina sa umjerenim povećanjem njegove ukupne koncentracije u ćelijama [163,164]. U solubilnoj formi Hsp27 može da bude prisutan u krvi, sekretovan iz ćelija miokarda, ali i endotelnih ćelija i glatkih mišića u zidovima krvnih sudova. Pretpostavlja se da su njegove ekstracelularne koncentracije (pr. koncentracije u krvi) proporcionalne njegovim intracelularnim koncentracijama [165]. Značaj Hsp27 je procjenjivan i kod bolesnika sa koronarnom arterijskom bolešću (KAB) koji trpe stalnu ili povremenu miokardijalnu ishemiju. Koncentracija Hsp27 u plazmi je bila značajno veća kod bolesnika kod kojih je koronarografijom verifikovano postojanje KAB u odnosu na kontrolnu grupu. Takođe, njegove koncentracije su bile veće u bolesnika sa dvo- i tro-sudovnom KAB u poređenju sa jedno-sudovnom. Težina KAB procijenjena Gensini skalom (surogat za stepen miokardijalne ishemije) nije korelirala sa koncentracijama Hsp27 [166].

II HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

Naučno-radna hipoteza je zasnovana na postavci da su GP-BB i Hsp27 senzitivni i specifični markeri ranog miokardnog stresa kod vaterpolista.

Očekuje se da postoji značajna razlika u produkciji GP-BB i Hsp27 kod vaterpolista koji su bili izloženi fizičkom stresu i onih koji to nisu bili.

Očekuje se da postoji korelacija između koncentracija GP-BB kao markera rane ishemije i Hsp27 kao protektivnog markera kardiomiocita.

III PREDMET I CILJ ISTRAŽIVANJA

Na osnovu svih prethodno iznijetih podataka iz literature postavili smo sljedeći *predmet istraživanja*:

Utvrđiti značaj glikogen fosforilaze tip bb (GP-BB) i hit šok proteina 27 (Hsp27) kao senzitivnih i specifičnih markera miokardnog stresa kod vaterpolo igrača muškog pola.

Shodno predmetu istraživanja postavili smo *cilj istraživanja*:

- Pokazati da postoji značajna razlika u koncentracijama GP-BB između vaterpolista koji su bili izloženi fizičkom stresu i vaterpolista koji to nisu nakon prvog, tridesetog i šezdesetog minuta.
- Pokazati da postoji značajna razlika u koncentracijama Hsp27 nakon prvog, tridesetog i šezdesetog minuta kod vaterpolista koji su bili izloženi fizičkom stresu u odnosu na vaterpoliste koji nisu bili.
- Utvrditi da li postoje značajne korelacije između koncentracija GP-BB i Hsp27 u prvom, tridesetom i šezdesetom minutu kod vaterpolista koji su bili izloženi fizičkom stresu i vaterpolista bez stresa.

IV MATERIJALI I METODE

Ispitivanje predstavlja prospektivnu i eksperimentalnu studiju kojom je obuhvaćeno 20 vaterpolo igrača muškog pola koji igraju u međunarodnim i nacionalnim ligama. Svim ispitanicima i trenerima date su detaljne informacije o ciljevima, toku, učestvovanju i eventualnim neželjenim efektima istraživanja. Svi ispitanici su prije otpočinjanja istraživanja dali pismenu saglasnost za učestvovanje u istraživanju. Cjelokupan protokol istraživanja je sproveden u prisustvu trenera.

Kriterijumi za isključivanje iz studije su bili: ženski pol, skorija akutna oboljenja, povrede i/ili infekcije, istorija ozbiljnih hroničnih oboljenja, sportisti mlađi od 16 godina, pušači i koji uzimaju suplemente.

Vaterpolo igrači su metodom slučajnog odabira podijeljeni u dvije grupe koje međusobno odgovaraju po polu, godinama starosti, dužini aktivnog bavljenja vaterpolom i nivou utreniranosti:

- Grupa koja je izložena fizički napornom treningu izdržljivosti (eksperimentalna grupa; n=10)
- Grupa koja nije trenirala (kontrolna grupa; n=10)

Trening izdržljivosti kod vaterpolista je trajao 1 sat u bazenu Instituta “Dr Simo Milošević” u Igalu, dimenzija 33x25 metara i sa temperaturom vode od 26°C. Trening se sastojao iz četiri faze u kojima su ispitanici plivali definisane etape, podijeljene u dionice sa pauzama između, i određenim brzinama:

1. aerobna ili uvodna-1500 metara laganim tempom u dionicama od 50 metara sa kratkim pauzama (oko 10 sekundi)
2. aerobno-anaerobna – 800 metara bržim tempom u dionicama od po 100 metara sa nešto dužim pauzama (oko 30 sekundi)
3. anaerobno-glikolitička ili laktatna-200 metara maksimalnom brzinom u dionicama od 50 metara sa pauzama koje su trajale dvostruko duže od preplivavanja dionice

4. anaerobno-alaktatna-100 m maksimalnom brzinom u dionicama od 25 metara sa dugim pauzama i to najmanje duplo dužim od vremena trajanja preplivane dionice.

Svim ispitanicima je izmjerena tjelesna visina (TV) izražena u centimetrima (cm) na antropometru (GPM, Švajcarska) uz poštovanje proceduralnih pravila (ispitanik je bos, golglav, leđima okrenut visinometru, sa karakterističnim položajem glave). Ispitanicima je izmjerena i tjelesna masa (TM) izražena u kilogramima (kg) na elektronskoj vagi (Tefal, Francuska) uz poštovanje pravila (ispitanik u donjem vešu sa prethodno ispražnjenim crijevima i bešikom). Na osnovu dobijenih podataka za TV i TM izračunat je indeks tjelesne mase (BMI) po formuli: $BMI = TM/TV^2$, i izražen u kg/m^2 . Zdravo uhranjeni vaterpolisti su imali BMI od 18 do 25, a prekomjerno uhranjeni od 25 do 30 kg/m^2 . Procenat tjelesne masti je određivan uz pomoć analizatora bioelektrične impedance (BIA) (Omron, Japan). BIA je brza, neinvazivna metoda u kojoj se mjeri otpor propuštene struje bezbedne doze (800 μamp) kroz masno tkivo. Kada se podesi za ispitanika TV i TM, aparat na osnovu instaliranog softvera izračunava procentualni sadržaj masti u strukturi tijela. Kod profesionalnih sportista muškog pola idealan procenat je 7 do 14%, bez posebnog izdvajanja za vaterpoliste.

Svim ispitanicima je urađen ultrazvučni pregled srca na aparatu Core Vision (Toshiba, Japan) dvodimenzionalnim M-modom sa sondom od 3Hz. Ultrazvučni pregled je rađen od strane istog ljekara.

Materijal za ispitivanje su uzorci krvi, 5 ml venske krvi koji su uzorkovani sledećim redosledom:

1. Prije treninga (bazalno)
2. 1 minut nakon treninga (isto i za kontrolnu grupu)
3. 30 minuta nakon treninga (isto i za kontrolnu grupu)
4. 60 minuta nakon treninga (isto i za kontrolnu grupu)

Uzorci krvi su podijeljeni u dvije epruvete: jedna sa heparinom iz koje su se brojali leukociti (L) u komori metodom po Türku, a druga epruveta je bez heparina. Uzorak krvi bez heparina je centrifugiran 10 minuta 3000 obrtaja u minuti i dobijeni supernatant je podijeljen u dvije epruvete. Iz jednog uzorka supernatanta određivane su koncentracije magnezijuma (Mg) fotometrijom korišćenjem komercijalnog reagensa (Humana, Germany). Referentne vrijednosti 0.8 do 1.0 mmol/L.

Druga epruveta sa supernatantom je zamrzavana na -20°C i iz nje su određivane koncentracije GP-BB i Hsp27 primjenom imunosorbentnog testa povezanog sa enzimima (sandwich ELISA) korišćenjem komercijalnih kvantitativnih testova (Diagenics, USA za GP-BB, Calbiochem, USA za Hsp27). Referentne vrijednosti za GP-BB su $0.6\text{-}4\ \mu\text{g/L}$, odnosno $0.02\text{-}1\ \text{ng/ml}$ za Hsp27. Intenzitet boje je očitavan na $450\ \text{nm}$ na spektrofotometru (Microplate Manager Bio-Rad Laboratories, Inc).

U istim vremenskim intervalima svim ispitivanim vaterpolistima su mjerene vrijednosti krvnog pritiska, sistolnog i dijastolnog, i frekvencija srčanog rada na digitalnom aparatu (Omron M6, Japan).

Dobijeni rezultati su statistički obrađeni primjenom statističkog programa za Windows, verzija 17.0 (Statistical Package for Social Science-SPSS Inc., IL, USA). U svim grupnim uzorcima izračunavana je srednja vrijednost, standardna devijacija i varijansa. Radi utvrđivanja statističkih značajnosti dobijenih razlika između ispitivanih grupa korišćen je Studentov-t test, kao parametrijski i Mann Whitney ili Wilcoxonov rank test kao neparametrijski testovi. Pearsonova linearna korelacija je korištena za analizu korelacija između dobijenih koncentracija GP-BB i Hsp27, ali i sa KVS parametrima, brojem L i serumskim koncentracijama Mg. Statistički značajnim razlikama smatrane se vrijednosti $p < 0.05$, odnosno $p < 0.001$ visoko statistički značajnim. Svi dobijeni rezultati su prikazani numerički, tabelarno ili grafički.

V REZULTATI

Antropološke karakteristike vaterpolista

Antropološke karakteristike ispitivanih vaterpolista su prikazane u tabeli 1.

Tabela 1. Bazični statistički parametri antropoloških karakteristika eksperimentalne i kontrolne grupe vaterpolista

Vrijednosti	Eksperimentalna grupa			Kontrolna grupa			p
	Xmin-Xmax	Xsr	SD	Xmin-Xmax	Xsr	SD	
Godine starosti (godine)	16-19	17.30	1.05	16-19	17.30	1.06	ns
Tjelesna masa (kg)	66-92.40	81.94	7.77	68.90-98.00	83.80	9.63	ns
Tjelesna visina (cm)	176-189	181.80	3.61	175-198	185.1	7.64	ns
Indeks tjelesne mase (kg/m ²)	20.40-27.10	24.78	2.09	21.00-26.80	24.20	1.89	ns
Procenat tjelesne masti (%)	11.70-16.90	14.04	1.80	10.00-18.70	13.61	3.34	ns

Analizirane grupe vaterpolista nisu se međusobno razlikovale u antropološkim karakteristikama. Prosječna dužina aktivnog bavljenja vaterpolom je iznosila 4 godine, u eksperimentalnoj grupi od 3 do 7, a u kontrolnoj od 3 do 6.

Parametri kardiovaskularnog sistema kod vaterpolista

Krvni pritisak i frekvencija srčanog rada

Vrijednosti krvnog pritiska, sistolnog (SKP) i dijastolnog (DKP), i frekvence srčanog rada (SF) prije treninga (bazalne vrijednosti) kod analiziranih vaterpolista su date u tabeli 2.

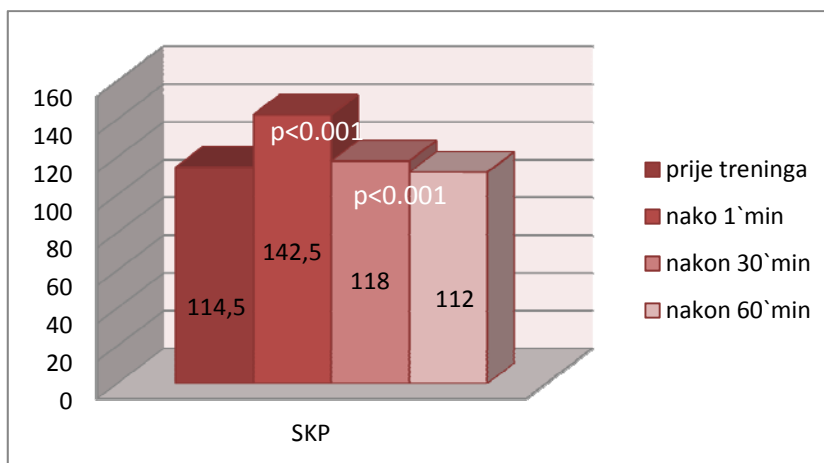
Tabela 2. Vrijednosti krvnog pritiska i srčana frekvencija u eksperimentalnoj i kontrolnoj grupi vaterpolista prije treninga (bazalne vrijednosti)

Vrijednosti	Eksperimentalna grupa			Kontrolna grupa			p
	Xmin-Xmax	Xsr	SD	Xmin-Xmax	Xsr	SD	
SKP (mmHg)	120-105	114.50	4.97	120-100	109	8.1	ns
DKP (mmHg)	65-80	73.50	5.30	75-55	68.50	7.09	ns
SF (/min)	72-64	68.20	2.70	96-57	75.20	10.21	ns

Vrijednosti SKP, DKP i SF prije treninga/bazalno nisu se značajno razlikovali između eksperimentalne i kontrolne grupe vaterpolista.

Varijacije u SKP uzrokovane treningom kod vaterpolista prikazane su grafikonom 1.

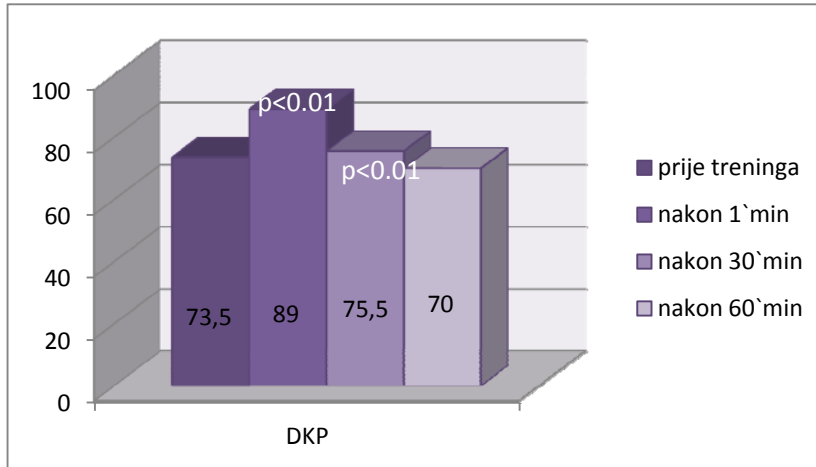
Grafikon 1. Varijacije SKP u eksperimentalnoj grupi vaterpolista prije i nakon treninga prvog, tridesetog i šezdesetog minuta



U prvom minutu nakon treninga dolazi do značajnog povećanja SKP u odnosu na njegove vrijednosti prije treninga ($t=12.385$; $p<0.001$). Sljedećih pola sata nakon treninga vrijednosti SKP opadaju i u tridesetom minutu su bile značajno niže u poređenju sa vrijednostima dobijenim u prvom minutu ($t= -14.080$; $p<0.001$).

Varijacije u vrijednostima DKP nakon treninga kod vaterpolista su prikazane u grafikonu 2.

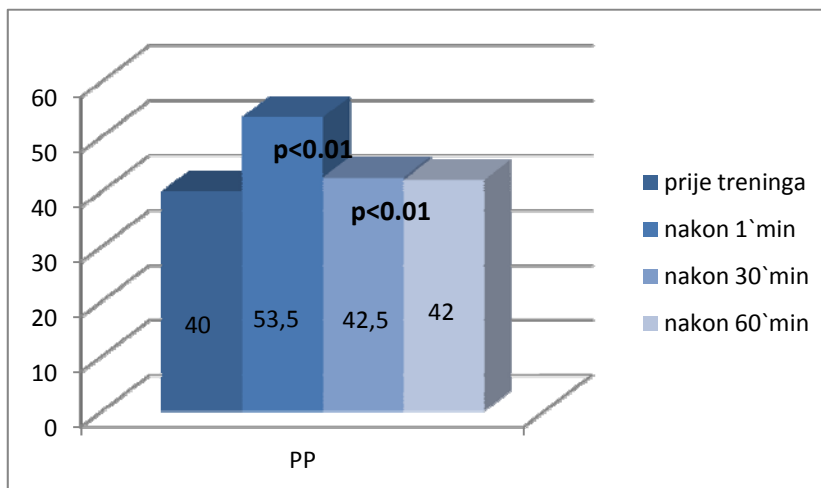
Grafikon 2. Varijacije DKP u eksperimentalnoj grupi vaterpolista prije i nakon treninga, prvog, tridesetog i šezdesetog minuta



DKP u prvom minutu nakon treninga je bio značajno veći u odnosu na njegove vrijednosti prije treninga ($t=6.433$; $p<0.01$). U narednih pola sata njegove vrijednosti opadaju odnosno nakon tridesetog minuta su bile značajno niže u odnosu na vrijednosti nakon prvog minuta ($t= -7.364$; $p<0.01$).

Varijacije pulsno g pritiska (PP) nakon treninga kod vaterpolista su prikazane u grafikonu 3.

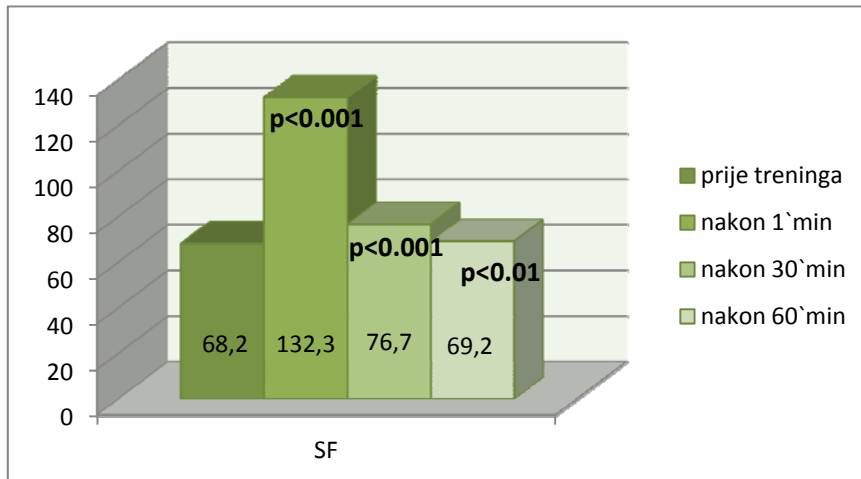
Grafikon 3. Varijacije PP u eksperimentalnoj grupi vaterpolista prije i nakon treninga prvog, tridesetog i šezdesetog minuta



PP je bio značajno veći u prvom minutu nakon treninga u poređenju sa njegovim vrijednostima prije treninga ($t=5.713$; $p<0.01$). Trideset minuta nakon treninga njegove vrijednosti su bile značajno niže u odnosu na vrijednosti u prvom minutu nakon treninga ($t= -5.659$; $p<0.01$).

Varijacije u SF nakon treninga u eksperimentalnoj grupi vaterpolista su prikazane u grafikonu 4.

Grafikon 4. Varijacije SF u eksperimentalnoj grupi vaterpolista prije i nakon treninga, prvog, tridesetog i šezdesetog minuta



SF značajno raste u toku treninga i u prvom minutu nakon treninga značajno je veća u poređenju sa SF prije treninga ($t=17.765$; $p<0.001$). U narednih trideset minuta SF se značajno smanjuje u odnosu na njenu vrijednost nakon prvog minuta ($t= -17.757$; $p<0.001$). Vrijednosti SF opadaju i slijedećih trideset minuta te je SF nakon šezdeset minuta bila značajno niža u odnosu na SF nakon trideset minuta ($t= -6.277$; $p<0.01$).

Kontrolna grupa vaterpolista nije bila izložena fizičkom naporu i nije bilo varijacija u analiziranim parametrima KVS u mjernim intervalima.

Tabela 3. Vrijednosti krvnog pritiska i srčane frekvence u eksperimentalnoj i kontrolnoj grupi vaterpolista prije treninga (bazalno) i nakon treninga prvog, tridesetog i šezdesetog minuta

Vrijednosti		Eksperimentalna grupa			Kontrolna grupa			p
		Xmin-Xmax	Xsr	SD	Xmin-Xmax	Xsr	SD	
SKP	1 min	135-150	114.50	4.97	110-122	114.70	5.25	<0.001
	30 min	105-130	142.50	6.35	105-120	113.04	4.83	ns
	60 min	100-120	112	5.87	100-120	113	6.32	ns
DKP	1 min	80-100	89	8.10	60-75	68.50	4.12	<0.001
	30 min	70-85	75.50	5.50	60-70	66.50	4.12	ns
	60 min	60-80	70	6.67	60-70	66	3.94	ns
PP	1 min	45-65	53.50	5.30	40-55	46.20	5.87	<0.013
	30 min	35-50	42.50	5.40	40-50	45.50	3.69	ns
	60 min	35-50	42	4.83	40-55	46	5.68	ns
SF	1 min	113-147	132.30	10.91	62-98	74.70	9.93	<0.001
	30 min	70-82	76.70	3.50	60-95	73.90	8.82	ns
	60 min	66-70	69.20	1.40	58-94	73.80	9.35	ns

U prvom minutu nakon treninga vaterpolisti eksperimentalne grupe su imali statistički značajno veće vrijednosti SKP ($t=12.784$; $p<0.001$), DKP ($t=8.947$; $p<0.001$), PP ($t=3.109$; $p<0.013$) i SF ($t=10.690$; $p<0.001$) u poređenju sa kontrolnom grupom. Dobijene razlike između tridesetog i šezdesetog minuta nisu bile značajne.

Karakteristike ehokardiografije vaterpolista

Svi testirani vaterpolisti su imali normalne vrijednosti za aortu u korjenu (do 3.5), lijevu predkomoru (do 3.8) i lijevu komoru: enddijastolni dijametar (EDD) (maksimalno do 5.4), septum (maksimalno do 1.1), zadnji zid (maksimalno do 1.0). Vrijednosti ejeckione frakcije (EF) su se kretale od 65 do 75%. Aortne, mitralne i trikupsidalne valvule su bile kompetentne. Dobijene vrijednosti za debljinu septuma (DS), zadnjeg zida (ZZ) i za EF u eksperimentalnoj i kontrolnoj grupi vaterpolista su prikazane u tabeli 4.

Tabela 4. Bazični statistički parametri za DS, ZZ i EF u eksperimentalnoj i kontrolnoj grupi vaterpolista

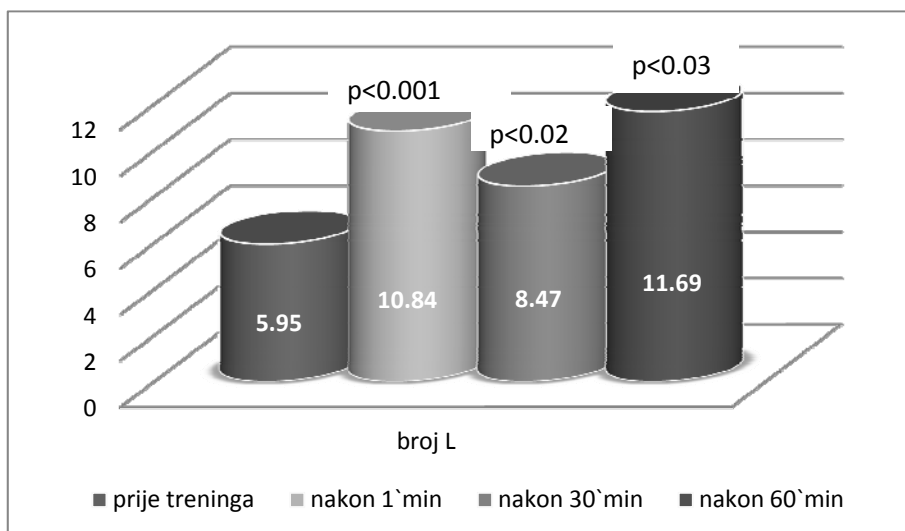
Vrijednosti	Eksperimentalna grupa			Kontrolna grupa			p
	Xmin-Xmax	Xsr	SD	Xmin-Xmax	Xsr	SD	
DS (mm)	0.70-1.10	0.88	0.12	0.80-1.10	0.95	0.11	ns
ZZ (mm)	0.70-1.0	0.90	0.08	0.80-1.0	0.94	0.07	ns
EF (%)	65-75	71.50	4.74	65-75	70	4.08	ns

Analizirani ehokardiografski parametri nisu bili u značajnim korelacijama sa antropološkim parametrima (godinama starosti, tjelesnim masom, visinom, indeksom tjelesne mase i procentom tjelesnih masti) i sa vrijednostima KP i SF kod vaterpolista podijeljenih u grupe. Međutim dužina aktivnog bavljenja vaterpolom je bila u značajnoj negativnoj korelaciji sa EF ($r = -0.735$, $p < 0.05$) ali i u značajnoj pozitivnoj korelaciji sa DS ($r = 0.803$; $p < 0.01$) u eksperimentalnoj grupi, ali ne i u kontrolnoj grupi.

Promjene broja leukocita uzrokovane treningom kod vaterpolista

Broj leukocita (L) u perifernoj krvi vaterpolista eksperimentalne grupe prije treninga i u definisanim vremenskim intervalima je prikazano u grafikonu 5.

Grafikon 5. Broj L u eksperimentalnoj grupi prije i nakon treninga prvog, tridesetog i šezdesetog minuta



Intenzivni trening kod vaterpolista uzrokuje značajne i dinamične promjene u broju L u perifernoj krvi. Odmah nakon treninga, u prvom minutu, dolazi do značajnog porasta broja L u odnosu na broj prije treninga ($t=9.705$; $p<0.001$). Sledećih trideset minuta njihov broj u perifernoj krvi se smanjuje te je nakon tridesetog minuta njihov broj značajno niži u odnosu na broj nakon prvog minuta ($t= -4.394$; $p<0.02$). Međutim, narednih pola sata njihov broj ponovo se značajno povećava odnosno broj L je značajno veći nakon šezdesetog minuta u poređenju sa brojem nakon tridesetog minuta ($t=4.314$; $p<0.03$).

Porast broja L na periferiji u prvom minutu nakon treninga je u značajnoj pozitivnoj korelaciji sa njihovim brojem nakon šezdesetog minuta ($r=0.825$; $p<0.003$).

Između broja L bazalno i u definisanim vremenskim intervalima kod vaterpolista kontrolne grupe nije bilo značajnih razlika

Tabela 5. Broj L u eksperimentalnoj i kontrolnoj grupi vaterpolista prije treninga (bazalno) i nakon treninga prvog, tridesetog i šezdesetog minuta

Broj L ($\times 10^9/L$)	Eksperimentalna grupa			Kontrolna grupa			p
	Xmin-Xmax	Xsr	SD	Xmin-Xmax	Xsr	SD	
prije treninga (bazalno)	5-7.10	5.95	0.63	3.90-6.80	5.48	0.94	ns
nakon 1` min	8.20-14.80	10.84	2.01	4.70-11.1	7.60	2.30	<0.024
nakon 30` min	5.50-12.50	8.47	2.07	4.50-10.90	6.64	2.03	ns
nakon 60` min	7-17	11.69	3.17	4.40-10.90	6.73	1.89	<0.003

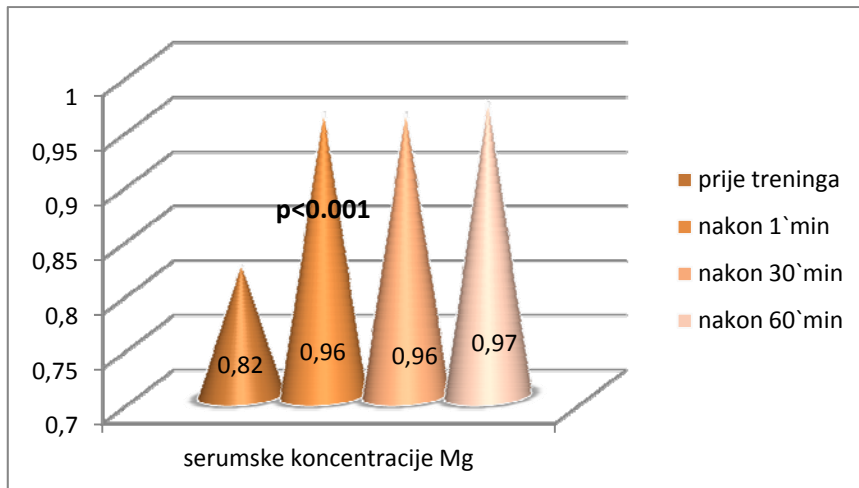
Vaterpolisti eksperimentalne grupe su imali značajno veći broj L na periferiji u poređenju sa kontrolnom grupom u prvom ($t=2.701$; $p<0.024$) i šezdesetom ($t=4.068$; $p<0.003$) minutu nakon treninga. Dobijena razlika nakon tridesetog minuta nije bila značajna.

Varijacije serumskih koncentracija magnezijuma nakon treninga kod vaterpolista

Serumske koncentracije magnezijuma (Mg) prije treninga su bile u referentnim granicama kod svih vaterpolista u eksperimentalnoj grupi. Međutim, nakon treninga koncentracije Mg u serumu rastu. Povišene serumske koncentracije nakon treninga je imalo 30% vaterpolista nakon prvog, 40% nakon tridesetog i 60% nakon šezdestog minuta.

Serumske koncentracije Mg u eksperimentalnoj grupi vaterpolista prije i nakon treninga u praćenim vremenskim intervalima su prikazani grafikonom 6.

Grafikon 6. Serumske koncentracije Mg u eksperimentalnoj grupi vaterpolista prije i nakon treninga prvog, tridesetog i šezdesetog minuta



Odmah nakon treninga, nakon prvog minuta, dolazi do značajnog povećanja serumskih koncentracija Mg u odnosu na njegove koncentracije prije treninga ($t=6.367$; $p<0.001$).

Serumske koncentracije Mg nakon treninga su bile u značajnim pozitivnim korelacijama: nakon prvog i tridesetog ($r=0.765$; $p<0.05$) i nakon tridesetog i šezdesetog minuta ($r=0.670$; $p<0.05$).

Analizom serumskih koncentracija Mg u kontrolnoj grupi vaterpolista u definisanim intervalima nije bilo značajnih odstupanja.

Tabela 6. Serumske koncentracije Mg u eksperimentalnoj i kontrolnij grupi vaterpolista prije treninga (bazalno) i nakon treninga prvog, tridesetog i šezdestog minuta

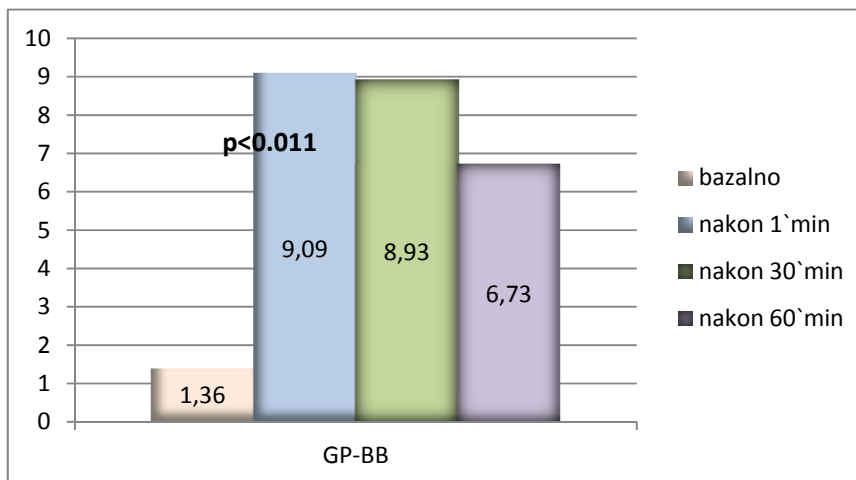
<i>Serumske koncentracije Mg (mmol/L)</i>	Eksperimentalna grupa			Kontrolna grupa			P
	Xmin-Xmax	Xsr	SD	Xmin-Xmax	Xsr	SD	
prije treninga (bazalno)	0.73-0.97	0.82	0.07	0.77-0.98	0.84	0.06	ns
nakon 1`min	0.78-1.10	0.96	0.10	0.73-0.97	0.82	0.08	<0.001
nakon 30`min	0.80-1.18	0.96	0.13	0.79-1.28	0.88	0.14	ns
nakon 60`min	0.74-1.09	0.97	0.10	0.74-0.99	0.85	0.08	<0.001

Serumske koncentracije Mg su bile značajno veće nakon prvog ($t=6.576$; $p<0.001$) i šezdesetog minuta ($t=6.103$; $p<0.001$) u eksperimentalnoj grupi u poređenju sa kontrolnom. Dobijene razlike za trideseti minuta nakon treninga nisu bile značajne.

Glikogen fosforilaza tip BB

Serumske koncentracije glikogen fosforilaze tip BB (GP-BB) prije treninga su bile u referentnim vrijednostima kod svih vaterpolista eksperimentalne grupe. Nakon izlaganja treningu serumske koncentracije GP-BB rastu. Povišene koncentracije su dobijene kod 40% vaterpolista nakon prvog i tridesetog i 10% nakon šezdesetog minuta.

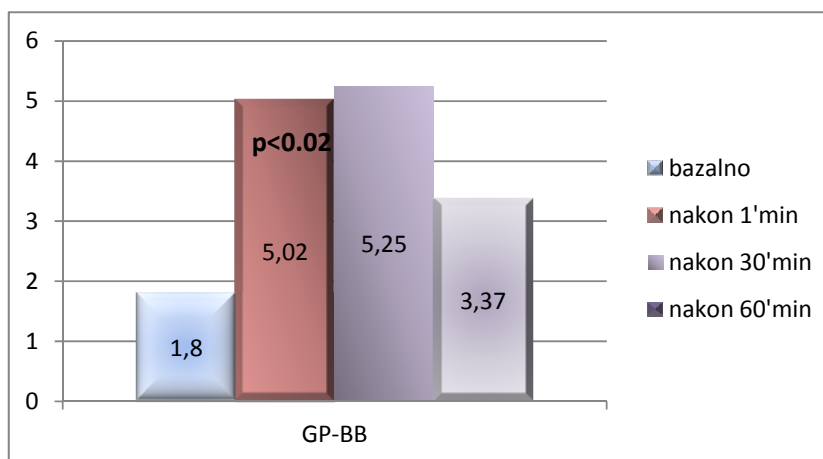
Grafikon 8. Serumske koncentracije GP-BB u eksperimentalnoj grupi prije i nakon treninga, prvog, tridesetog i šezdesetog minuta



Fizički napor treninga kod vaterpolista dovodi do značajnog povećanja serumskih koncentracija GP-BB te su one prvog minuta nakon treninga bile značajno veće u poređenju sa koncentracijama prije treninga ($t=3.205$; $p<0.011$). U mjernim intervalima nakon treninga koncentracije GP-BB u serumu su bile u značajnim pozitivnim korelacijama: nakon prvog i tridesetog ($r=0.895$; $p<0.001$) i nakon tridesetog i šezdesetog minuta ($r=0.697$; $p<0.05$).

Određena dinamika u praćenju serumskih koncentracija GP-BB je dobijena i kod vaterpolista u kontrolnoj grupi.

Grafikon 9. Serumske koncentracije GP-BB u kontrolnoj grupi vaterpolista



Vaterpolisti u kontrolnoj grupi su imali značajno veće serumske koncentracije GP-BB u prvom minutu u poređenju sa bazalnim ($t=2.752$; $p<0.02$), a koncentracije nakon tridesetog i šezdesetog minuta su bile u značajnoj pozitivnoj korelaciji ($r=0.861$; $p<0.01$).

Tabela 8. Serumske koncentracije GP-BB u eksperimentalnoj i kontrolnoj grupi vaterpolista prije treninga (bazalno) i nakon prvog, tridesetog i šezdesetog minuta

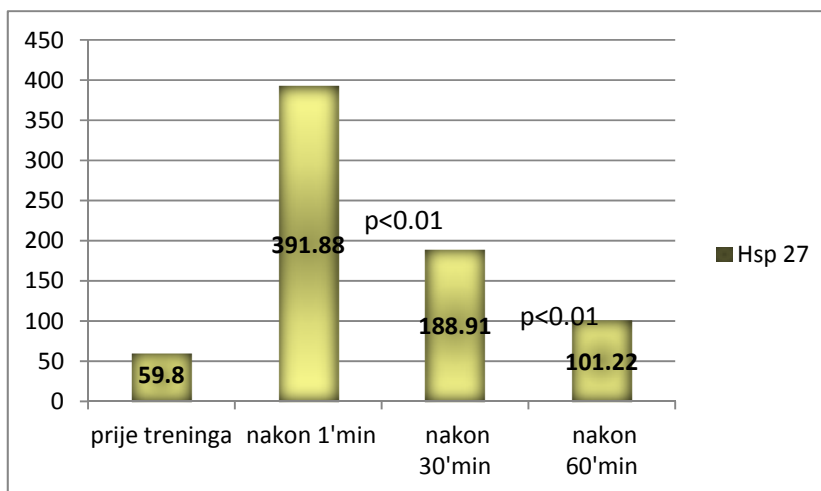
<i>Serumske koncentracije GP-BB (ng/mL)</i>	Eksperimentalna grupa			Kontrolna grupa			P
	Xmin-Xmax	Xsr	SD	Xmin-Xmax	Xsr	SD	
prije treninga	0.51-2.43	1.36	0.87	0.51-6.35	1.80	2.03	ns
nakon 1`min	1.15-24.69	9.09	7.67	2-9.37	5.02	2.36	ns
nakon 30`min	1.63-27.03	8.93	8.67	1.63-13.99	5.25	3.77	ns
nakon 60`min	2.74-16.77	6.73	4.19	1.15-6.73	3.37	1.57	<0.025

Vaterpolisti eksperimentalne grupe su imali statistički značajno veće serumske koncentracije GP-BB nakon šezdesetog minuta u poređenju sa vaterpolistima kontrolne grupe ($t=2.677$; $p<0.025$). Dobijene razlike za ostale mjerne intervale nisu bile od statističke značajnosti.

Heat shock protein 27 (Hsp27)

U serumu svih vaterpolista eksperimentalne grupe koncentracije Hsp27 prije treninga su bile povišene. Međutim, nakon treninga povišene koncentracije je imalo 50% vaterpolista nakon prvog, 60% nakon tridesetog i 80% nakon šezdesetog minuta.

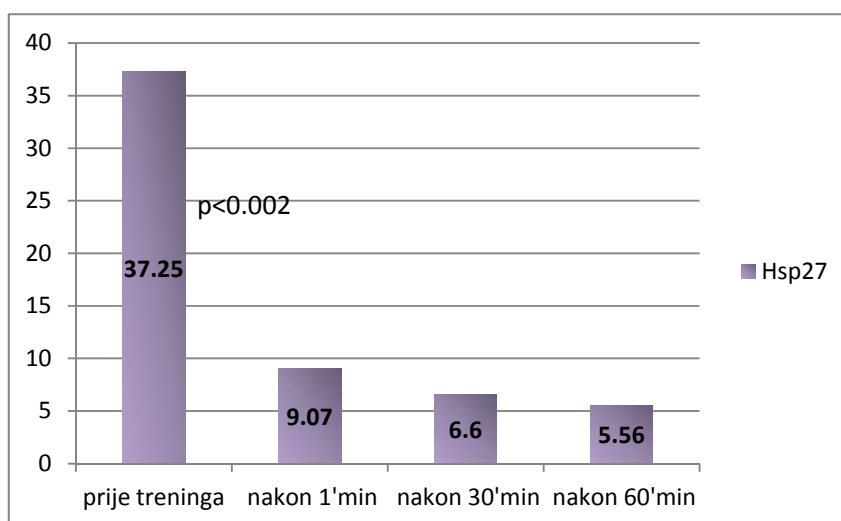
Grafikon 10. Serumske koncentracije Hsp27 u eksperimentalnoj grupi vaterpolista prije i nakon treninga prvog, tridesetog i šezdesetog minuta



Serumske koncentracije Hsp27 kod vaterpolista nakon treninga su bile u značajnim pozitivnim korelacijama: između prvog i tridesetog ($r=0.992$; $p<0.01$) odnosno između tridesetog i šezdesetog minuta ($r=0.994$; $p<0.01$).

U kontrolnoj grupi vaterpolista prije treninga svi ispitanici su imali povišene koncentracije Hsp27. Međutim, dobijene su izmjene u analiziranim vremenskim intervalima. Tako su njegove povišene koncentracije imali 30% vaterpolista nakon prvog, 70% nakon tridesetog i 20% nakon šezdesetog minuta.

Garfikon 11. Serumske koncentracije Hsp27 u kontrolnoj grupi vaterpolista bazalno i nakon prvog, tridesetog i šezdesetog minuta



U kontrolnoj grupi vaterpolista bazalne serumske koncentracije su bile značajno veće u poređenju sa koncentracijama nakon prvog minuta ($t=4.125$; $p<0.002$).

Tabela 9. Serumske koncentracije Hsp27 u eksperimentalnoj i kontrolnoj grupi vaterpolista prije treninga (bazalno) i nakon prvog, tridesetog i šezdesetog minuta

<i>Serumske koncentracije Hsp27 (ng/mL)</i>	Eksperimentalna grupa			Kontrolna grupa			p
	Xmin-Xmax	Xsr	SD	Xmin-Xmax	Xsr	SD	
prije treninga (bazalno)	18.28-141.40	59.80	44.35	12.81-82.42	37.25	19.26	ns
nakon 1` min	1.82-3426.96	391.88	1069.23	3.50-26.80	9.07	7.61	ns
nakon 30` min	3.77-1639.47	188.91	511.22	3.25-10.43	6.60	2.50	ns
nakon 60` min	5.08-840.30	101.22	260.50	1.99-17.36	5.56	4.95	ns

Mada su prosječne koncentracije u eksperimentalnoj grupi vaterpolista bile veće u poređenju sa kontrolnom grupom nije bilo statističke značajnosti zbog velikog raspona dobijenih koncentracija u eksperimentalnoj grupi.

Korelacije GP-BB

1. Serumske koncentracije GP-BB prije treninga nisu značajno korelirale sa analiziranim antropološkim karakteristikama, parametrima KVS, sa brojem L i serumskim koncentracijama Mg i Hsp27.
2. Prvog minuta nakon treninga serumske koncentracije GP-BB su bile u značajnoj negativnoj korelaciji sa SKP ($r = -0.696$; $p < 0.05$) i u značajnoj pozitivnoj korelaciji sa serumskim koncentracijama Mg ($r = 0.770$; $p < 0.01$) i Hsp27 ($r = 0.716$; $p < 0.05$).
3. Trideset minuta nakon treninga serumske koncentracije GP-BB su i dalje bile u značajnoj negativnoj korelaciji sa SKP ($r = -0.644$; $p < 0.05$) i u značajnoj pozitivnoj korelaciji sa Hsp27 ($r = 0.776$; $p < 0.01$).
4. Šezdesetog minuta nakon treninga nije bilo značajnih korelacija serumskih koncentracija GP-BB.

Korelacije Hsp27

1. Serumske koncentracije Hsp27 prije treninga nisu bile u značajnim korelacijama sa analiziranim antropološkim i KVS parametrima, sa brojem L i serumskim koncentracijama Mg i Hsp27.
2. Prvog minuta nakon treninga značajna pozitivna korelacija je dobijena između serumskih koncentracija Hsp27 i GP-BB ($r=0.716$; $p<0.05$).
3. Trideset minuta nakon treninga i dalje se održava značajna pozitivna korelacija Hsp27 i GP-BB ($r=0.776$; $p<0.01$), ali i značajna negativna korelacija između serumskih koncentracija Hsp27 i SKP ($r= -0.726$; $p<0.05$).
4. Šezdesetog minuta nakon treninga serumske koncentracije Hsp27 su bile u značajnoj negativnoj korelaciji sa SKP ($r= -0.706$; $p<0.05$).

VI DISKUSIJA

Vaterpolo sport se igra duže od jednog vijeka i jedan je od najstarijih olimpijskih sportova, od Pariza 1900. godine. Uprkos njegovoj bogatoj historiji i evoluciji malo je izučavan i samim tim malo je informacija o fiziološkim zahtjevima sporta [155]. Riječ je o kolektivnom sportu u kome su igrači izloženi naporu visokog intenziteta u kratkom vremenskom intervalu u kome moraju da plivaju, skaču i da šutiraju loptu sa kratkim momentima za predah ili izlaganjem naporu manjeg intenziteta. No, vaterpolo je i kontaktni sport u kome igrači „vode bitke“ protiv svojih protivnika kroz blokade, premlaćivanja, kontakte i guranja [156,157]. Napor visokog intenziteta je praćen velikom energetsom potrošnjom koja se obezbjeđuje aerobnim i anaerobnim sistemima organizma. Smatra se da se 50-60% energije obezbjeđuje aerobno, 30-35% anaerobno, a 10-15% je tkz „neposredna energija“ adenzin trifosfata-fosfo kreatin sistema (ATP-PC) [156]. Oba značajna energetska sistema u organizmu, aerobni i anaerobni, moraju da budu izgrađeni kroz treninge sa ciljem razvijanja muskulature i kardiovaskularnog sistema (KVS) za takmičenja odnosno izazove koje postavlja vaterpolo sport [158]. Pozitivne fiziološke prednosti su i uvećanje srčanog mišića kako bi pumpalo više krvi na periferiju i povećanje tjelesne mase kao rezultat fizičke borbe i kontakata među igračima [159].

Antropološke karakteristike vaterpolista

Godine bavljenja vaterpolom, učestalost i intenzitet treninga indukuju značajne morfološke adaptacije kod igrača [160]. Konačan izgled tijela i njegova kompozicija u svakom sportu, pa tako i u vaterpolo sportu, je rezultat fenomena označenog kao „sportska morfološka optimizacija“ [161]. Same varijacije u izgledu tijela su pod značajnijim uticajem faktora iz okoline u odnosu na genetsku predispoziciju [162]. Vaterpolo sport sa svim specifičnostima, od vodene sredine, fizičkog napora visokog intenziteta i brojnih grubosti, ali i posebnih zahtjeva koji se postavljaju pred elitne vaterpoliste, značajno je izmijenio izgled njihovog tijela. Posljednjih godina elitni vaterpolisti su visočiji, dužih udova, širih ramena i užeg struka [160].

Prosječne vrijednosti tjelesne mase i tjelesne visine u našem uzorku su odgovarale prosječnoj starosti odnosno fazi rasta ispitanika. Dobijeni rezultati su bili u skladu sa literaturnim podacima Španskih reprezentativaca [163], svjetskog šampionskog tima iz 1991.godine [164] kao i podacima iz Hrvatskih prvoligaških klubova [160].

Indeks tjelesne mase (BMI) je poslednjih godina privukao posebnu pažnju kao senzitivian pokazatelj tjelesne adaptacije zahtjevima modernog vaterpola. Analizirajući adaptacione promjene elitnih vaterpolista Norton je ukazao da BMI spada u kategoriju „apsolutnih sportskih morfoloških optimizacija“ [161]. Dobijene prosječne vrijednosti na našem uzorku su bile u skladu sa literaturnim: sa BMI Španskih reprezentativaca [163], generacijama hrvatskih vaterpolista iz 1980 i 1995 godine [160].

Vodena sredina, njena gustina i temperatura, značajno utiču na procentualnu zastupljenost tjelesnih masti koje su značajno veće kod vaterpolista u poređenju sa kopnenim sportovima [165]. Manja gustina tijela zbog većeg sadržaja ili procenta masti u tijelu je prednost u vaterpolo sportu, dok u drugim sportovima veći procenat tjelesne masti utiče negativno na fiziološki učinak sportista [163]. U našem uzorku procenat tjelesnih masti je u skladu sa literaturnim [166,167,168].

Parametri kardiovaskularnog sistema kod vaterpolista

Aktivni sportisti imaju značajno niže vrijednosti krvnog pritiska u mirovanju ali i nakon testa fizičkim opterećenjem u odnosu na osobe koje nisu sportisti [169]. Objašnjenje ovog fenomena je u aktivnim i hroničnim efektima sportske aktivnosti na KVS profesionalnog sportiste. *Akutni efekti* su povećanje udarnog i minutnog volumena, vazodilatacija u aktivnim mišićima i vazokonstrikcija u koži i neaktivnim oblastima, povećanje volumena krvi u perifernoj i plućnoj cirkulaciji, pri čemu fizičko opterećenje u ležećem položaju rezultuje većim porastom pritiska u plućnoj cirkulaciji od opterećenja istog intenziteta u uspravnom položaju. *Hronični efekti* su povećanje elastičnosti arterijskih krvnih sudova i kapaciteta sudovne mreže u aktivnim tkivima, jačanju uticaja parasimpatičkog i smanjenja aktivnosti simpatičkog nervnog sistema, smanjenju lučenja kateholamina u mirovanju i u uslovima fizičkog opterećenja, i depresija bazalnih aktivnosti sino-atrijalnog čvora [170,171]. Adaptacioni mehanizmi rezultuju ekonomičnijim radom srca u miru i fizičkom opterećenju, smanjenjem frekvencije srčanog rada i krvnog pritiska u mirovanju i njihovim manjim porastom tokom fizičkog opterećenja kod profesionalnih sportista [172,173,174].

Ponašanje krvnog pritiska i frekvencije srčanog rada tokom treninga i fizičkog opterećenja zavise od vrste aktivnosti, nivoa opterećenja, spoljne temperature i medijuma u kome se ova opterećenja obavljaju [174]. Aktivnost vaterpolista je klasifikovana kao visoko dinamička [16] u vodenoj sredini. Samim potapanjem tijela u vodu gubi se efekat djelovanja sile zemljine teže na organizam odnosno specifična težina tijela se bitnije ne razlikuje od one koju ima voda i težina tijela potopljenog u vodu iznosi svega nekoliko kilograma. Na ovo izjednačavanje specifičnih težina tijela i vode, ali i na održavanje tijela na površini vode za vrijeme plivanja, u značajnoj mjeri utiče sadržaj potkožnog masnog tkiva. Obzirom da nema posebnih zahtjeva za održavanje tijela nasuprot djelovanju sile zemljine teže odnosno nema posturalnih mišićnih kontrakcija, ukupna mišićna masa aktivirana za vrijeme plivanja je manja nego u drugim fizičkim aktivnostima na kopnu (pr. trčanje). To znači da je potreba organizma za kiseonikom i njegova potrošnja značajno manja nego kod trčanja istim intenzitetom [169].

Vodeni medijum ima i negativne efekte koji otežavaju kretanje tijela u njoj. Prvenstveno viskoznost i otpor vode su daleko veći u poređenju sa vazduhom. Povećanjem brzine plivanja stvaraju se vrtlozi koji u velikoj mjeri povećavaju opterećenje organizma. Niska temperatura vode kojoj je izloženo tijelo bez posebne zaštite, može biti značajan nepovoljan činitelj koji s jedne strane otežava plivanje, a sa druge strane stvara uslove za abnormalne reakcije KVS [169,175]. Upravo sve ovo skupa čini da se KVS reakcija na opterećenje u vaterpolu sportu značajno razlikuje od reakcija na bilo koji drugi fizički napor [176]. Horizontalan položaj tijela tokom plivanja u vaterpolu ima pozitivan efekat na srce u smislu povećanja priliva krvi u srce, povećanja end-dijastolnog volumena srčanih komora i srčanog volumena, te je udarni minutni volumen srca veći nego pri vertikalnom položaju tijela. U toku utakmice igrač provede od 33.1 do oko 45% vremena u različitim varijantama horizontalne pozicije, odnosno od 55 do 66.9% u različitim varijantama vertikalne pozicije [156].

Značajan faktor koji određuje reakciju KVS sistema u vaterpolu je hidrostatski pritisak vode na tijelo sportiste, prvenstveno na disajne pokrete grudnog koša odnosno otežan inspirijum uz normalan ekspirijum. Na ovaj način se povećava intratorakalni pritisak, i u mirovanju je povezan sa otežanim vraćanjem venske krvi u srce, a samim tim i sa smanjenim minutnim volumenom srca [169].

Frekvencija srčanog rada i krvni pritisak u vaterpolista

Frekvencija srčanog rada je uvijek niža za vrijeme plivanja u poređenju sa trčanjem ili drugih dinamičkim aktivnostima istog intenziteta [177,178]. Objašnjenja su zasnovana na vodenom medijumu. Naime, imerzija lica u vodu u kombinaciji sa zadržkom disanja dovodi do smanjenja frekvence disanja, fenomen poznat kao „bradikardija ronilaca“. Ukoliko je voda hladnija utoliko je i bradikardija izraženija. Ovakav manji porast srčane frekvence je povezan sa imerzijom lica u vodu i nezavistan je od fizičkog napora odnosno prisutan je i kod statičkog i dinamičkog napora ali i u mirovanju [179]. Ova pojava može da se objasni refleksom koji se prenosi na kardioinhibitorni centar, vagus i sinoatrijalni pejsmejker, dovodeći do usporavanja frekvencije srčanog rada. Inspiratorna apnea za vrijeme plivanja dovodi do razdraženja receptora lociranih u karotidnom sinusu sa prenošenjem ovih impulsa u kardioinhibitorni centar što jača aktivnost vagusa odnosno rezultuje manjim porastom frekvence srčanog rada u vaterpolista u poređenju sa drugim aktivnostima istog intenziteta na suvom. Ne treba zanemariti ni povećanje udarnog volumena pri plivanju, te bi smanjenje porasta frekvence srčanog rada bilo i kompenzatorni mehanizam [169]. Analizirajući frekvenciju srčanog rada u našem istraživanju dobijeno je da njene vrijednosti značajno rastu prvog minuta nakon treninga. U narednih pola sata od treninga značajno padaju i nakon jednog sata od završetka treninga se vraćaju na svoje vrijednosti prije treninga.

Vrijednosti dijastolnog i sistolnog krvnog pritiska u našem istraživanju su značajno rasli u prvom minutu nakon treninga u odnosu na vrijednosti prije treninga i nakon pola sata su značajno padale i vraćale se na bazalne vrijednosti. Porast vrijednosti krvnog pritiska su posljedica povećanja perifernog otpora u krvnim sudovima skeletne muskulature i kože zbog djelovanja povećanog hidrostatskog pritiska vode i termoregulacione vazokonstrikcije krvnih sudova u koži [175,176]. Obzirom da je toplotna sprovodljivost vode značajno veća u odnosu na toplotnu sprovodljivost vazduha, tijelo u hladnoj vodi veoma brzo odaje svoju toplotu. Održavanje termostabilnosti organizma aktivira termoregulacione mehanizme za stvaranje i očuvanje toplote: povećanje periferne vazokonstrikcije, usporavanje cirkulacije krvi, smanjenje frekvence srčanog rada i minutnog volumena srca [180].

Ehokardiografske osobenosti kod vaterpolista

Profesionalno bavljenje sportom i trenažni procesi najvišeg nivoa često su udruženi sa morfološkim promjenama srca, uključujući uvećanje lijeve komore, zadebljanje njenih zidova i

uvećanje njene mase [181]. Ovo uvećanje mase lijeve komore kao rezultat treninga se označava kao „*sportsko srce*“ [182]. U literaturi se navode dvije morfološki različite forme sportskog srca u zavisnosti od dominacije dinamičkih ili statičkih komponenti vježbanja. Sportisti izloženi dinamičkim komponentama visokog intenziteta (pr.vaterpolo, trčanje) mogu da razviju uvećanje veličine lijeve komore sa proporcionalnim uvećanjem debljine zida kao posljedica preopterećenja volumenom. Pretpostavlja se da na ovaj način nastaje ekscentrična hipertrofija lijeve komore koja se karakteriše nepromijenjenim odnosom između debljine zida i dijametra lijeve komore. Svaki dinamički trening (trening izdržljivosti) povećava krvni pritisak odnosno opterećenje pritiskom što na dalje povećava volumen punjenja odnosno opterećenje volumenom. Bavljenje sportom u kome dominiraju statičke vježbe visokog intenziteta (pr.dizanje tegova) predominantno povećavaju debljinu zida lijeve komore sa nepromijenjenom veličinom lijeve komore kao posljedica preopterećenja visokim sistolnim pritiskom. Rezultanta je koncentrična hipertrofija lijeve komore sa povećanim odnosom debljine zida i dijametra lijeve komore [183]. Svaki statički trening (trening snage i brzine) povećava srčanu frekvencu, minutni volumen i krvni pritisak.

Najveća sportska srca nalazimo u visoko dinamičkim sportovima (sportovi izdržljivosti), gdje spada i vaterpolo. U svjetskoj literaturi najveći zabilježeni volumen sportskog srca je zabilježen u Hrvatskoj kod vaterpoliste i iznosio je 1700ml. Težina srca kod sportista iznosi 300 do 400 grama (normalno iznosi 300 grama). Ukoliko bi srce doseglo tkz. kritičnu težinu od 500 grama tada bi bilo ugroženo jer se paralelno s pojačanom hipertrofijom ne stvara dovoljan broj kapilara koji bi srčani mišić snadbijevali neophodnim kiseonikom [1]. Da li će doći do uvećanja srca i u kom stepenu zavisi od: (1) vrste sportske aktivnosti, (2) intenziteta treninga, (3) dužine sportskog staža i (4) pola i konstitucionalnih osobina [1]. Do rendgenski vidljivog uvećanja srca može proći i više godina, ali se na ehokardiogramu nakon samo jednog vrlo intenzivnog treninga može uočiti hipertrofija zidova lijeve komore [184].

Vaterpolo sport po definiciji je sport sa kombinovanim dinamičkim i statičkim vježbanjima gdje se aktiviraju velike grupe mišića odnosno sa kombinacijom ekstremnih opterećenja volumenom i pritiskom. Istovremenim opterećenjem volumenom i pritiskom može da se objasni uvećanje unutrašnjeg dijametra lijeve komore koje se viđa kod vaterpolista [181].

Ehokardiografska mjerenja su dale jasne dokaze o adaptaciji srca na fizičku aktivnost. U brojnim studijama je analizirana funkcionalna i morfološka adaptacija srca na izlaganje fizičkim

aktivnostima kroz duži vremenski period kod sportista i amatera. Zajednički imenitelj u ovim studijama je hipertrofija lijeve komore kod sportista ali ne i kod ne-sportista [185,186,187,188,189]. Dokazi o postojanju jasnih ehokardiografskih znakova hipertrofije lijeve komore kod vaterpolista su publikovani u brojnim studijama ukazujući da je intenzivni trenažni program indukovao njene morfološke i funkcionalne promjene [190,191,192]. Povećanje sistolnog volumena može da bude udruženo sa veličinom lijeve komore. Samo povećanje lijeve komore povećava dijastolno (pre-load) lijeve komore [193] što na drugoj strani rezultuje boljim dijastolnim istezanjem miokarda koje prema Frank-Starlingovom [194] zakonu dovodi do bolje sistolne funkcije odnosno do povećanja sistolnog volumena [195].

U našem uzorku ispitanih vaterpolista ehokardiografski parametri su bili u referentnim opsezima, što je u skladu sa prosječnim godinama starosti. Dužina aktivnog bavljenja vaterpolom je bila u značajnoj negativnoj korelaciji sa ejectionom frakcijom odnosno u značajnoj pozitivnoj korelaciji sa debljinom septuma.

Varijacije broja leukocita uzrokovane naporom

Fiziologija vježbanja je napredovala od primarnih analiza kardiorespiratornog i muskuloskeletnog sistema ka uključivanju više fizioloških sistema i njihovih uticaja na vježbanje. U skorije vrijeme posebno aktuelan je imunski sistem, odnosno imunologija vježbanja [196]. Napor vježbanja postavlja širok spektar zahtjeva tijelu zavisno od forme, intenziteta i trajanja napora. Vježbanje visokog intenziteta uzrokuje oštećenja tkiva, produkciju hormona stresa i izmjene u broju i funkciji cirkulišućih imunokompetentnih ćelija. Mnogi kliničko-fizički stresovi, kao što su: hirurške intervencije, traume, opekotine i septična stanja, indukuju slične obrasce hormonskog i imunskog odgovora poput napora vježbanja [197]. Specifične promjene koje prate naporno vježbanje su: porast reaktanata akutne faze, mobilizacija i aktivacija leukocita, oslobađanje inflamatornih medijatora (citokina), oštećenja tkiva sa ćelijskim infiltratima, produkcija slobodnih radikala i aktivacija komplementa, koagulacione kaskade i fibrinolitičkih puteva [198,199].

Dobro je poznato da vježbanje indukuje neposrednu leukocitozu koja traje sve dok se napor održava [200]. Pored ove neposredne leukocitoze koja se brzo normalizuje nakon prestanka izlaganja naporu, postoji i odložena prolongirana leukocitoza koja svoj vrh dostiže nekoliko sati kasnije [201]. Fenomen neposredne, a naročito odložene leukocitoze je privlačio

malu pažnju istraživača, te je slabo okarakterisan. U literaturi je opisano nekoliko međusobno isprepletanih mehanizama.

Odmah po prestanku vježbanja dolazi do distribucije tečnosti od plazme ka tkivima i smatra se da na ovaj način nastaje do 7% promjena u broju različitih ćelija uobličeni krvnih elemenata. Promjene iznad ovog procenta se pripisuju mobilizaciji ćelija [201]. Samo povećanje broja leukocita unutar prvih 15 minuta od početka aktivnosti je isuviše brzo da bi se objasnilo ubrzanim ćelijskim diobama [202,203] ali dovoljno za migraciju iz tkiva u cirkulaciju. Dosta je neslaganja po pitanju koja tkiva služe kao izvor leukocita. U literaturi se kao mogući izvori navode: limfatici, slezina, jetra, pluća, marginalni depoi i kosna srž [196].

Izlaganje naporu vježbanja uzrokuje porast vrijednosti krvnog pritiska i frekvence srčanog rada [204,205]. Povećanje brzine protoka krvi, prelazak sa laminarnog u turbulentan tok, uzrokuje oslobađanje u cirkulaciju ćelija koje se „drže“ uz zidove krvnih sudova (fenomen demarginacije) [203]. Nezaobilazan je adrenalin, odnosno porast [206] njegove koncentracije kao odgovor na izlaganje stresogenima (pr. naporni trening) ali i povećana senzitivnost leukocita na adrenalin [207]. Na ovaj način se smanjuje afinitet vezivanja leukocita za ćelijske membrane u zidovima krvnih sudova, čime može da se objasni „ispiranje“ leukocita u cirkulaciju. Povećanje protoka krvi i efekata mišićne pumpe na limfatike ubrzava povratak limfe u cirkulaciju preko torakalnog ductusa [208] čime se značajno povećava broj limfocita [202]. Smatra se da povećanje limfocitne populacije za 80-113% može da bude pokazatelj limfatičnog pražnjenja obzirom da su ove ćelije distribuirane u intersticijalne prostore, u limfi i limfnim čvorovima [208,209].

Neutrofilni granulociti povećavaju broj kao odgovor na napor vježbanja [202,201,210,211]. Ukoliko trening traje duže od 30 minuta oni daju vodeći doprinos leukocitozi [201,212]. Sama lokalna oštećenja tkiva su infiltrirana neutrofilima koji su odgovorni za fagocitozu ćelijskog debrisa [213]. Roberston sa saradnicima je pokazao da je povećanje neutrofila nakon vježbanja prolaznog karaktera i da se njihove vrijednosti vraćaju na normalu unutar 45 minuta od prekida napora [214], a Simonson da nekompletna normalizacija njihovog broja nastaje unutar 30 minuta [196].

Kontradiktorne su studije koje govore o promjenama funkcija i broja monocita i makrofaga. Po jednim njihovim funkcijama su ili smanjene ili nepromijenjene, a broj može da bude ili nepromijenjen ili povećan ili smanjen [215,216,201,201,211]. Ukazano je da se broj

makrofaga povećava 2 sata nakon izlaganja naporu [212], ali u brojnim studijama nije određivan karakter njihovog odgovora u ovom vremenskom intervalu.

Po prekidu napora neutrofil i monociti se ne vraćaju u cirkulaciju već ostaju u mišićima koji su oštećeni vježbanjem kao dio odgovora u akutnoj fazi. Ovakva oštećenja i odgovor reaktanata akutne faze se objašnjava visokim intramuskularnim pritiskom koji uzrokuje prekid lokalnog protoka krvi odnosno ishemiju koja je odgovorna za ćelijska oštećenja. Naporno vježbanje dovodi do oštećenja mišićnih vlakana i vezivno-tkivnih elemenata čime se neposredno aktivira komplementarna kaskada koja je odgovorna za demarginaciju neutrofila. Posljedično brzo povećavanje infiltracije neutrofila u mišićnom tkivu započinje unutar prvog sata nakon vježbanja [217,218].

U literaturi se dosta polemizalo o eozinofilima i bazofilima odnosno o izostanku promjena u njihovom broju u cirkulaciji kao odgovor na naporno vježbanje [211]. Izostanak se objašnjavao njihovom distribucijom u tijelu, kratkim poluživotom [219], ali i njihovim malim brojem u cirkulaciji [201].

Limfocitna populacija u cirkulaciji pokazuje dinamiku promjena u broju, po tipu i neposrednog i odloženog porasta ukupnog broja [211]. Smatra se da je većina promjena u ukupnom broju limfocita vezana za značajno povećanje broja ćelija označenih kao „prirodni ubica“ (eng natural killer cell-NK) [202,212,211], čak 80-92%, [196] i smanjenja odnosa helper i supresornih T limfocita za 50%. Upravo ovo smanjenje funkcije i broja T helper limfocita se smatra odgovornim za porast broja NK ćelija [220]. Intenzivni napor vježbanja je praćen povećanjem serumskih koncentracija glikokortikoida i kateholamina, hormona koji su odgovorni za smanjenu (down-regulaciju) u produkciji T-helper citokina čime se ostvaruje supresivni efekat na celularni imunitet [221].

Obično se efekat vježbanja na leukocite izražava kroz povećanje ili smanjenje njihovog broja u cirkulaciji. Neophodno je uzeti u obzir i činjenicu da ćelije koje su „isprane“ iz tkiva u cirkulaciju mogu da se razlikuju od onih ćelija koje su normalno prisutne u cirkulaciji. U tom kontekstu su objavljivane studije u kojima je ukazano postojanje povećanja broja i gustine adhezivnih ili aktivacionih markera u toku vježbanja, što može da bude samo refleksija njihovog prisustva na normalnim ćelijama koje su lokalizovane u marginalnim pulovima. Međutim, dospijevanje ovih ćelija u cirkulaciju rezultuje ili slabljenjem ili povećanjem funkcionalnosti cirkulišućih ćelija, uzimajući u obzir njihovu relativnu nezrelost ili aktivacioni status [220].

McCarthy analizirajući fenomen leukocitoze ukazao je da je neposredna leukocitoza (do 30-tog minuta) posledica djelovanja noradrenalina ili adrenalina ili oba ova hormona kroz njihovu aktivnu ulogu u mobilizaciji leukocita tokom vježbanja, a da je odložena neutrofilija (od 30-180-og minuta) posljedica povećanja serumskih koncentracija kortizola [201]. Istovremeno Hansen u svom istraživanju je ukazao da ne postoji korelacija između serumskih koncentracija kortizola i odložene limfopenije [222].

Saglasno literaturnim navodima u našem uzorku trening je indukovao leukocitozu koja je pokazivala značajnu dinamiku: rasta od 182% prvog minuta nakon treninga, pada od 78% u 30-tom minuta i rast od 196% nakon 60-og minuta.

Varijacije serumskih koncentracija magnezijuma indukovanih naporom

Magnezijum (Mg) je široko rasprostranjen element koji ima značajne uloge u fundamentalnim procesima ćelijskog metabolizma. Aktivan je sudionik u preko 300 enzimskih reakcija značajnih za procese katabolizma i produkcije novih hemijskih produkata [223]. Primjeri njegovih uloga su: procesi razlaganja glikogena, oksidacija masti, sinteze proteina, ATP sinteza ali i kao sistem sekundarnih glasnika. Mg je i značajan fiziološki regulator stabilnosti ćelijske membrane, te mu pripadaju značajne uloge u funkcionisanju neuromuskularnog, KVS, imunskog, hormonskog i CNS [224,225,226].

Interesovanje o potencijalno štetnim efektima fizičke aktivnosti na koncentracije Mg u populaciji sportista počelo je nakon dijagnostifikovanja njegove deficijencije uz normalan fizikalni i neurološki nalaz, ali i normalne biohemijske parametre, kod teniserke koja je imala učestale epizode mišićnih spazama nakon dužeg vježbanja na otvorenom [227]. Serumске koncentracije Mg, iako se obično koriste za mjerenje zastupljenosti Mg u ishrani fizički aktivnih osoba, su relativno neosjetljivi pokazatelji kod graničnih Mg-ovih statusa [224]. I upravo ova neosjetljivost uglavnom isključuje zaključke da fizička aktivnost ne pokazuje neželjene efekte na Mg-ov status. Istovremeno, dostupni su nam radovi u kojima se ukazuje da su serumске koncentracije Mg u referentnim opsezima ukoliko je njihov unos odgovarajući bez obzira na fizičku aktivnost [228].

Istraživači su ukazali da bez obzira na relativno statične serumске koncentracije Mg u tijelu se odvija njegova značajna redistribucija i povećava se njegova ekskrecija iz organizma kao odgovor na vježbanje. Pravac i veličina redistribucije Mg u cirkulaciji je pod uticajem intenziteta prethodnog vježbanja [229]. U ranim studijama ukazano je da kratkotrajno vježbanje

visokog intenziteta dovodi do prolaznog povećanja serumske koncentracije Mg za 5 do 15%, a koncentracije se vraćaju na bazalne vrijednosti nakon jednog dana. Povećanje koncentracije Mg u serumu je bilo praćeno sa smanjenjem volumena plazme. Studije novijih datuma su ukazale da kontinuirana umjerena aktivnost i kratkotrajno anaerobno vježbanje visokog intenziteta rezultuju povećanjem serumskih koncentracija Mg [230,231,232]. Objašnjenje za ovakav skok serumske koncentracije Mg nije u smanjenju volumena plazme, već u oštećenjima mišićnih ćelija što je potvrđeno neposredno nakon vježbanja [231] i ova hipoteza je podržana povećanom aktivnošću CK [232]. Oštećenjem mišićnih ćelija nastaju uslovi za prenos Mg u ekstracelularnu tečnost tokom mišićnih kontrakcija, slično kao i kalijuma [233].

U ranijim i novijim studijama je ukazano da prolongirane vježbe izdržljivosti (pr. trčanje maratona) dovode do smanjenja serumskih koncentracija Mg. Ovako nastao pad u njegovim serumskim koncentracijama se vraća na bazalne vrijednosti nakon jednog dana, a fenomen se objašnjava usmjeravanjem Mg u druge djelove tijela i njegovim povećanim izlučivanjem putem urina i znoja [230,234,235]. U ekstracelularnim prostorima se nalazi svega 1% od ukupnog Mg u organizmu, te su izučavani djelovi tijela u koja se usmjerava Mg nakon izlaganja organizma pretjeranom fizičkom naporu. Kao primarna mjesta su identifikovani eritrociti, adipociti i miociti, mada uzimajući u obzir njegov značaj za biohemijske procese to mogu biti praktično sva mjesta u organizmu [233].

Posebnu pažnju istraživača je privlačila intraćelijska koncentracija Mg odnosno njene izmjene uzrokovane naporom. U ranim radovima je ukazano da nakon napornog vježbanja dolazi do porasta intraćelijske koncentracije Mg u eritrocitima, ali i da je taj porast bio sličan padu u njegovim serumskim koncentracijama [230]. Potom je ukazano da nakon maratona postoji pad u intraćelijskoj koncentraciji Mg u eritrocitima [236], potom da anaerobno vježbanje ne dovodi do promjena u ukupnoj koncentraciji Mg ali da se registruje porast koncentracije jonizovanog Mg u eritrocitima i trombocitima uz pad njegovih serumskih koncentracija [237]. Izostanak promjena u koncentraciji ukupnog intraćelijskog Mg ukazuje na njegovu redistribuciju između intra i ekstraćelijskih prostora, a porast frakcije intraćelijskog jonizovanog Mg u eritrocitima je značajan pokazatelj da fizički napor mijenja intraćelijske signalne puteve i metaboličke procese koji uključuju Mg [233].

Prolongirano izlaganje napornim vježbama uzrokuje usmjeravanje Mg iz seruma u adipocite, obzirom da dolazi do porasta koncentracija slobodnih masnih kisjelina [230]. U fizički

napornim vježbama prvo se odvija aktivna glikogenoliza u mišićnim ćelijama i kako se njegove rezerve iscrpljuju, tako se Mg preusmjerava u adipocite za procese lipolize kada nastaju slobodne masne kiseline [233]. Usmjeravanje Mg iz ekstracelularnih prostora u ćelije skeletne muskulature odvija se sporo i paralelno sa padom koncentracije serumskog Mg [238] i kako se napor nastavlja dolazi do porasta Mg u mišićima [239]. Porast koncentracije Mg u ćelijama skeletnih mišića može da bude rezultat povećane potrebe za visoko energetskim fosforom i oksidativnim stresom kao posljedica povećane potrošnje kiseonika u toku mišićnih kontrakcija [233]. Stepen translokacije Mg iz ekstracelularnih prostora na ova mjesta je moduliran nivoom aerobne energije ili njene potrošnje.

Na nivo Mg u organizmu značajno utiču i mehanizmi njegovog izlučivanja nakon izlaganja fizičkom naporu. Značajno gubljenje Mg nastaje znojenjem, naročito kod intenzivnog fizičkog napora. Literaturni podaci variraju: 12% ukupnog Mg dnevno [240], 18 do 60 mg/L znoja [241], 3.4 mg/L u toplim i suvim uslovima [242] i 12.2 mg/L u toplim i vlažnim uslovima [243]. Drugi značajan mehanizam izlučivanja Mg iz organizma jeste preko urina bez obzira da li se radi o kratkotrajnom ili prolongiranom izlaganju fizičkom naporu [230,232]. Međutim, publikovane su i drugačije studije: izlučivanje Mg putem urina je redukovano dva sata nakon vježbanja i vraćaju se na bazalne vrijednosti nakon 48 sati [244]; izlučivanje je redukovano i nakon istrčanog maratona [234,235] usled povećane reapsorpcije Mg na nivou bubrežnih tubula jednu sedmicu nakon maratona [235].

Izlaganje napornom treningu elitnih vaterpolista je uzrokovalo povećanje serumskih koncentracija Mg i ovo povećanje je imalo određenu uzlaznu dinamiku unutar jednog sata nakon napora. Tako su povišene koncentracije Mg dobijene kod 30% ispitanika u prvom minutu, 40% nakon 30 minuta i 60% nakon 60 minuta. Obzirom na teško dostupne literaturne podatke o njegovim koncentracijama kod vaterpolista, moguće objašnjenje leži u vodenoj sredini odnosno djelovanju hidrostatskog pritiska koji otežava kretanje u smjeru ekstraćelijskih prostora i smanjenje gubljenja elektrolita putem znojenja.

Varijacije serumskih koncentracija glikogen fosforilaze tip BB (GP-BB) uzrokovane naporom

Sportiste mnogi smatraju posebnom populacijom zdravih jedinki sa jedinstvenim životnim stilom koji su naizgled neranjivi i u stanju da postignu izuzetna fizička dostignuća [245,246,247]. Više od 100 godina pažnja je usmjerena ka uticaju intenzivnog, profesionalnog

bavljenja sportom na stanje KVS [248,249]. Ehokardiografija u poslednjih 30 godina kao neinvazivna kvantitativna metoda je obezbjedila značajne podatke o srčanom remodelingu u sklopu sistematičnih treninga sa posebnim fokusiranjem na promjene označene kao „atletsko ili sportsko srce“ [248,249]. Sve je to skupa dovelo do boljeg razumijevanja uticaja fizičkog napora sportista na remodeling srca koje može u konačnom da imitiraju određena patološka stanja koja su odgovorna za iznenadnu smrt ili pak za progresiju nastalih oboljenja [250].

Produženo i naporno vježbanje, kome su izloženi elitni sportisti, je odgovorno za nastajanje zamora u skeletnim mišićima i njihova oštećenja [251]. No, njihov uticaj na srčani mišić, na integritet i funkcionalnost, manje je poznat. Nekim autorima je ova činjenica bila zbunjujuća obzirom da srčani mišić, za razliku od skeletnih, ne može da „napravi predah“ nakon vježbanja [252]. Prema novijim rezultatima kratkotrajno vježbanje pokazuje mali štetni uticaj na funkcionalnost lijeve komore, a uticaj prolongiranih napornih vježbanja na funkcionalnost i integritet srčanog mišića je kontroverzniji [253].

Akutno naporno vježbanje može da uzrokuje pojavu biomarkera oštećenja ćelija miokarda i prolaznu disfunkciju lijeve komore. Klinički značaj ovih promjena nije dovoljno jasan i izdvojila su se dva problema koje treba riješiti. *Prvi problem:* da li prolongirano naporno vježbanje stvara određen stepen kardijalnog stresa i/ili oštećenja ćelija koje kroz kraće ili duže vrijeme može da ima štetne posljedice po zdravlje. *Drugi problem:* potreba za edukacijom osoba uključenih u medicinsku brigu profesionalnih sportista o mogućnosti tranzitorne redukcije srčanih funkcija i pojavljivanje troponina T i I nakon vježbanja [254]. Veliki broj autora smanjenje sistolne funkcije lijeve komore i pojavu porasta koncentracije kardio-specifičnih biomarkera kod profesionalnih sportista tumači kao posljedicu srčanog zamora ili ošamućenja [255,255,256,253].

Nekoliko hipoteza je postavljeno u cilju objašnjenja srčane disfunkcije u odsustvu KVS oboljenja. Među njima se izdvajaju: neadekvatna perfuzija miokarda, disfunkcija endoplazmatskog retikuluma kroz izostanak povezanosti ekscitacije i kontrakcije, smanjenje senzitivnosti miofilamenata na kalcijum (Ca), povećanje koncentracije intraćelijskog Ca i stvaranje slobodnih radikala [257,258,259,260,261]. Pored heterogenosti u mogućim mehanizmima nastanka, sindrom srčanog zamora je veoma heterogen i u svojoj manifestaciji, ali im je zajednički imenitelj izlaganje miokarda prolaznim epizodama ishemije koje nisu dovoljno duge da uzrokuju trajna ili ireverzibilna oštećenja [262].

Jednostavno pitanje „šta je ishemija?“ nije praćeno jednostavnim odgovorom. Kardiolozi su pronašli kompromisno rješenje kroz vraćanje na bazične razlike i/ili sličnosti između fiziološke i biohemijske ishemije [263], oba primjenjiva kod sportista. *Fiziološka ishemija* se definiše kao regionalna ili ograničena ishemija u jednom segmentu srca gdje postoji redukovan protok krvi čime se narušava normalna kontraktilna funkcija [264]. *Biohemijska ishemija* je odgovor na djelovanje niza uglavnom ekstra-kardijalnih neuro-hormonalnih signala koji se aktiviraju kako bi se održala kontraktilna sposobnost srca. Na ćelijskom nivou aktiviraju se mehanizmi za održavanje kontraktilnosti u stanjima smanjenog dopremanja kiseonika. Ukoliko je njihovo djelovanje kratkotrajno ne dolazi do značajnijih narušavanja ćelijske homeostaze niti do velikih molekularnih oštećenja, te se ćelija u potpunosti oporavlja [264].

Uticaj napornog vježbanja na miokard profesionalnih sportista, bez obzira na odsustvo arterioskleroze koronarnih krvnih sudova i hipertrofije komora, može da se razumije kroz vazospazam koronarnih krvnih sudova, visoke koncentracije kateholamina i oštećenja ćelija endotela. Ovakve promjene su uglavnom reverzibilnog karaktera ukoliko postoji dovoljno vremena između napora za regresiju ishemije i oporavak ćelija endotela [265]. Napor indukuje vazospazam koji je odgovoran za nastajanje lokalizovane i nijeme ishemije [266], a etiologija vazospazma koronarnih arterija nije u potpunosti razumljiva [265]. Sužavanje dijametra koronarnih arterija od 40 do 60% u trajanju od jednog sata može da uzrokuje oštećenje endotela i trombozu [267]. Vazospazam koronarnih arterija kod sportista nastaje kao odgovor na povećanje frekvence srčanog rada, koja se s druge strane objašnjava kroz povećanje koncentracije kateholamina [267]. Na eksperimentalnom modelu psa izloženog submaksimalnim napornim vježbanjima je ukazano da se koncentracije kateholamina povećavaju dovoljno da bi se povećao tonus koronarnih arterija posredstvom α -adrenergičkih receptora [268]. Kod utreniranih sportista ovako nastali defekti u perfuziji se održavaju 40 ± 7 minuta nakon prekida napora. Rezultat je dobijen kod profesionalnih atletičara koji su bili izloženi submaksimalnom opterećenju koje je prekinuto zamorom na osnovu praćenja redistribucije talijuma [269].

Naporno vježbanje indukuje značajno veće potrebe miokarda za kiseonikom u cilju održavanja kontraktilnosti. Povećan zahtjev miokarda za kiseonikom mora biti izbalansiran sa povećanim koronarnim protokom koji je određen metaboličkom vazodilatacijom i pritiskom. 70-85% koronarne perfuzije se odvija tokom dijastole, dok je u toku sistole usljed intraventrikularnog pritiska i pritiska na same zidove krvnih sudova značajno redukovan ili

zaustavljen [257,258]. Održavanje kontraktilnosti miokarda je apsolutno zavisno od aerobnog metabolizma kada se kroz procese oksidativne fosforilacije na nivou mitohondrija stvaraju molekuli visoko-energetskih fosfata (ATP). Rezerve ATP u kardiomiocitima su male i nedovoljne, kao takve se brzo troše u stanjima nedovoljnog dopremanja kiseonika [270]. Anaerobni metabolizam uslovljava stvaranje ograničenih količina ATP, i aktiviraju se procesi glikolize [270].

Ključno mjesto u procesu glikolize u kardiomiocitima pripada GP-BB odnosno u regulaciji metabolizma ugljenih hidrata kroz mobilizaciju glikogena. U stanjima očuvane ćelijske homeostaze GP-BB je prisutan u kardiomiocitima u formi makromolekularnog kompleksa udružen sa glikogenom i sarkoplazmatskim retikulumom. Međutim u stanjima tkivne hipoksije dolazi do razlaganja glikogena kako bi se obezbjedila neophodna energija za kontraktilnost ćelija miokarda, GP-BB se oslobađa iz makromolekularnog kompleksa i prevodi u solubilnu formu. Na ovaj način enzim postaje slobodan u citoplazmi. Intraćelijska koncentracija mu brzo raste u stanjima hipoksije te se brzo stvara i koncentracijski gradijent koji je neophodan za njegovu slobodnu difuziju kroz ćelijsku membranu ukoliko je povećana njena propustljivost. Da bi njegova koncentracija u krvi mogla da se uvećava neophodno je istovremeno postojanje snažne glikogenolize i povećana propusnost ćelijske membrane. Primjera radi, snažna glikogenoliza postoji i u stanjima povećanog srčanog rada ili nakon aplikovanja kateholamina ili glukagona ali tada izostaje povećanje permeabilnosti ćelijske membrane te ne dolazi do njegovog oslobađanja u cirkulaciju [271,272,43,87,273,274,275]. U stanjima ishemije miokarda koncentracije mu jako brzo rastu već u toku prvog sata, a vraća se na normalne vrijednosti već nakon 6 do 10 sati. Posjeduje visoku senzitivnost i specifičnost već u prvom satu prema literaturnim podacima [276].

Posljednjih godina je dosta bilo govora o GP-BB kao značajnom ishemijskom markeru [277]. Posebno je interesantan sa aspekta ne postojanja slobodnih koncentracija u citoplazmi kardiomiocita, za razliku od troponina [278]. Dobijanje povećanih koncentracija GP-BB u cirkulaciji je dokaz da su u ćelijama miokarda aktivirani procesi glikogenolize uz povećanu propusnost ćelijskih membrana. Koncentracije GP-BB su se značajno povećavale kod profesionalnih trkača nakon pretrčanih 21 km [279], kod biciklista koji su kompletirali trku u dužini od 4800 km [280], dok su trkači nakon pretrčanih 5 km imali značajno povećanje njegovih koncentracija koje su bile u značajnoj pozitivnoj korelaciji sa porastom glikemije [281].

Saglasno literaturi u našem uzorku elitnih vaterpolista prvog minuta nakon završenog treninga povećana koncentracija serumskih koncentracija GP-BB je imalo 40% ispitanika.

Povećanje koncentracije srčanih biomarkera, među njima i GP-BB, nije praćeno dokazima o nastanku trajnih oštećenja na srcu. Među brojnim objašnjenjima Bonetti ukazuje na postojanje ubrzanog srčanog rada kroz duži vremenski period [255]. Kod vaterpolista frekvencija srčanog rada je veća od 150/minutu u 91.8% aktuelnog trajanja utakmice [156]. Dalje, naporno vježbanje indukuje povećane potrebe miokarda za kiseonikom koje u kombinaciji sa vazospazmom može da inicira nastanak regionalne ili nijeme ishemije i kontraktilnu disfunkciju, što je dokazano na animalnim modelima [258,282,283]. U vaterpolo sportu 30 do 35% ukupne energije se obezbjeđuje kroz anaerobne procese [156], a potrošnja kiseonika je prosječno 6 do 20% veća nego kod profesionalnih plivača [156].

U literaturi su uglavnom bili prisutni radovi koji su pratili kinetiku srčanih biomarkera unutar 24 sata nakon napora kada su se njihove koncentracije vraćale na bazalne ili koncentracije prije napora. Prema Lippi-ju koncentracije GP-BB su se vraćale na bazalne 6 sati nakon pretrčanog polumaratona [279]. To je mnoge autore navelo na zaključke o postojanju srčanog zamora a ne oštećenja [278]. Mi smo se odlučili da pratimo kinetiku ili dinamiku promjena GP-BB koncentracija unutar prvog sata nakon napornog treninga, ne samo neposredno poslije. Obzirom da se defekti u perfuziji koronarnih arterija održavaju oko 40 minuta nakon napora [269] koncentracije smo određivali i u tridesetom i šezdesetom minutu. Saglasnom literaturi o perfuzionim defektima, u našem uzorku 40% elitnih vaterpolista je i nakon tridesetog minuta imalo povišene serumske koncentracije GP-BB, a nakon šezdesetog minuta 10% ispitanika. Obzirom na značaj enzima za ćelije kardiomiocita njegove koncentracije su bile u značajnim pozitivnim korelacijama između vremenskih intervala mjerenja. Međutim, interesantni su i rezultati vezani za njihove koncentracije u kontrolnoj grupi, gdje nije bilo uticaja napora ali jeste emocionalnog stresa, te su i kod njih dobijene korelacije između mjernih tačaka. Važnije jeste da je napor indukovao značajno veće koncentracije samo u šezdesetom minutu, čime se ukazuje na snažan uticaj neurohormonalnih faktora na ćelije kardiomiocita kod elitnih vaterpolista.

Varijacije serumskih koncentracija Hsp27

Opažanje da ćelije miokarda sintetiziraju proteine stresa (Hsp-e) kao odgovor na djelovanje različitih stresogenih stimulusa iz spoljne sredine inspirisalo je mnogobrojne naučnike da istraže širinu njihovog protektivnog djelovanja. Precizni mehanizmi njihovog djelovanja u ćelijama

miokarda nisu do kraja razjašnjeni. Predloženi mehanizmi su: da funkcionišu kao molekularni pratioci koji veoma brzo mogu da obnove strukturalni integritet i metaboličke funkcije u ćelijama koje su bile izložene djelovanju intraćelijskog stresa [284], povećavaju aktivnost katalaza, redoks enzima koji redukuje oštećenja slobodnim radikalima u ishemičnom miokardu [285], čuvaju visoko-energetske fosfate u ćelijama jer posjeduju ATP-sparing efekat [286], aktiviraju ATP zavisne kalijumove kanale uključene u citoprotekciju [284] i posjeduju anti-apoptično djelovanje [287]. Ukoliko pak nastaju ozbiljna oštećenja ćelija ili ćelija umire dolazi do njihovog oslobađanja u interćelijske prostore u solubilnoj formi [288].

Predmet našeg istraživanja je bio Hsp27. U kardiomicitima sisara konstitutivno je prisutan u citoplazmi u velikim koncentracijama do 1700 ng/mg, lociran uglavom u perinuklearnom regionu [289]. Pod djelovanjem stresogenog stimulusa dolazi do njegove translokacije u jedro, a po prestanku njegovog djelovanja vraća se perinuklearno što ukazuje na njegov značaj za „ispravke i/ili popravke“ u procesima sinteze na nivou jedra [290]. U ćelijama miokarda Hsp27 sprečava fragmentaciju citoskeleta, povećava intraćelijsku koncentraciju glutationa, umanjuje senzitivnost na efekte oksidativnog stresa u sklopu ishemije i reperfuzije [152,151]. Hsp27 se smatra odličnim kandidatom za procjenu kardioprotektivnog djelovanja jer štiti ćelije miokarda od apoptoze, infarkta i oksidativnog stresa [291,143,292,293]. Povećana genska ekspresija Hsp27 u ćelijama kardiomiocita olakšava oporavak kontraktilnih funkcija nakon ishemije, poboljšava odgovor miofilamenta na prisutni intraćelijski kalcijum, sprečava degradaciju troponina T i I [294] i odgovoran je za stabilizaciju mitohondrijalnih membrana [295]. Mada je nedovoljno dokaza smatra se da Hsp27 ima direktnu ulogu u očuvanju srčanog tkiva kroz procese konzerviranja ćelijskog citoskeleta [296,297,298].

Ukazano je da su kardioprotektivni efekti Hsp27 u ishemiji određeni procesima njegove fosforilacije uz umjereno povećanje intraćelijske koncentracije ukupnog Hsp27 [152,151]. Fosforilacija se odvija na serinskim reziduama koje su lokalizovane na pozicijama 78 i 82, a sama fosforilacija se odvija kroz aktivnost MAP kinaza 2/3 [299] i protein kinaza C i D [300]. Fosforilisani mono i dimeri Hsp27 posjeduju povećan afinitet vezivanja za aktinske filamente što ih čini odgovornim za dinamiku i stabilnost aktina odnosno za strukture citoskeleta kardiomiocita [140].

Objavljeni su rezultati koji ukazuju na kardioprotektivno djelovanje Hsp27 na brojnim animalnim modelima. Na animalnim modelu psa je potvrđena različita ekspresija u normalnoj i

insuficijentnoj lijevoj komori [142]. Miševi kod kojih postoji povećana ekspresija Hsp27 su bili zaštićeni od letalnog ishoda nakon ishemično/reperfuzionih oštećenja [143] dok su kardiomiociti pacova sa povećanom ekspresijom Hsp27 bili zaštićeni od ishemičnih oštećenja [144]. Koncentracije mu značajno rastu u bolesnika sa akutnim koronarnim sindromom u poređenju sa zdravom kontrolom. Takođe, njegove koncentracije su u značajnoj pozitivnoj korelaciji sa ukupnim holesterolom, ali ne i sa polom, godinama starosti, pušenjem, dijabetom i hipertenzijom [301].

Naporno vježbanje, akutnog i hroničnog karaktera, povećava koncentraciju Hsp-a u različitim tkivima, uključujući i ćelije miokarda. Vježbanje samo po sebi dovodi do ćelijskog stresa kroz različite mehanizme: povećanje temperature, potrošnje glukoze i rezervi ćelijskog glikogena, ishemiju, oksidativni stres, smanjivanje intraćelijske pH koncentracije, povećanje intraćelijskih koncentracija kalcijuma i mehaničko istezanje kardiomiocita [302,303,304,305,306]. Intenzivno i redovno vježbanje rezultuje povećanjem bazalnih koncentracija Hsp-a koje je direktno zavisno od intenziteta, trajanja i tipa vježbanja [307]. Samo povećanje bazalnih koncentracija Hsp-a ukazuje da je ovaj protektivni sistem funkcionalan u održavanju citoskeletnih struktura, redoks potencijala i ubrzavanje procesa biogeneze mitohondrija [308]. Saglasno literaturnim podacima svi ispitani elitni vaterpolisti su imali povišene bazalne koncentracije Hsp27.

Intraćelijske koncentracije Hsp27 su proporcionalne njegovim ekstraćelijskim koncentracije (pr. serumskim koncentracijama) [309]. Hsp27 reaguje odmah nakon izlaganja maksimalnim ekscentričnim vježbama kroz procese vezivanja za miofibrilarne proteine citoskeleta djelujući kao stabilizator narušenih strukturalnih proteina [308]. Translacioni procesi u njegovoj sintezi, kao odgovor na naporno vježbanje, mogu započeti u toku samog vježbanja, odmah po prestanku ili nekoliko sati kasnije, što je jedan od značajnih pokazatelja fizičke utreniranosti sportista [307]. Prvog minuta nakon treninga polovina ispitanih elitnih vaterpolista su imali povišene koncentracije Hsp27. Imajući u vidu da su svi ispitivani vaterpolisti imali povišene bazalne koncentracije izlaganje napornom treningu rezultuje potrebom za aktivacijom molekula Hsp27 kroz procese fosforilacije čime se smanjuje koncentracija slobodnog Hsp27 kako u ćelijama tako i u serumu. Fosforilisani molekuli Hsp27 se vezuje za oštećene strukturalne i funkcionalne intraćelijske proteine sa ciljem očuvanja homeostaze i funkcionalnosti pojedinačne ćelije. Prestanak stresogenog djelovanja napora postepeno dovode do porasta

serumskih koncentracija kod elitnih vaterpolista. Tako je 60% ispitanih vaterpolista imalo povišene serumske koncentracije Hsp27 nakon 30 minuta, odnosno 80% nakon 60 minuta.

Korelacije GP-BB sa kardiovaskularnim parametrima

GP-BB se posljednjih godina nametnuo kao značajan marker ishemijskih događanja na nivou miokarda. Kroz literaturu su prisutni brojni dokazi o njegovoj visokoj senzitivnosti kod visoko dinamičnih sportova, kakav je i vaterpolo. Prvenstveno srce je mišić i kroz trenažni program u vaterpolo sportu dolazi do njegovog jačanja i adaptacije, što je potvrđeno ehokardiografskim znacima kardijalne hipertrofije kroz značajno zadebljanje zida miokarda [310]. Aktiviranje velikih grupa mišića kod vaterpolista, sa posljedičnim povećanim potrebama za kiseonikom, rezultuje ubrzanjem srčanog rada što dovodi do trenutnog povećanja volumena arterijske krvi čime se povećava sistolni krvni pritisak dok dijastolni ostaje u normalnim vrijednostima. Povećane vrijednosti se normalizuju vrlo brzo nakon prekida vježbanja, naročito kod mlađih i utreniranih osoba [311].

Utrenirani sportisti kroz adaptacione mehanizme povećavaju za 15-30% maksimalni udarni i minutni volumen srca. Međutim, posjeduju i veću maksimalnu vaskularnu provodnost koja odslikava izmjene u vaskularnim strukturama skeletnih mišića [312,313]. Povećana sposobnost ili kapacitet vazodilatacije kod sportista vjerovatno doprinosi većem izlivanju krvi iz arterijskog u venski sistem u toku dijastole, čime se može objasniti izostanak razlika u vrijednostima dijastolnog pritiska kod sportista u poređenju sa nesportistima [314]. Sam porast sistolnog krvnog pritiska kod sportista je normalan adaptacioni odgovor koji je udružen sa povećanjem minutnog volumena i sa ciljem istovremenog održavanja perfuzionog pritiska u skeletnim mišićima i vitalnim organima u stanjima smanjenog sistemskog vaskularnog otpora [315].

Pretpostavka je da su elitni sportisti visoko utrenirani, zdravi i bez arteriosklerotičnih promjena na krvnim sudovima, ali kod njih združenim djelovanjem napora, visokih koncentracija kateholamina i vazospazma koronarnih krvnih sudova može da nastane lokalizovana i nijema ishemija. U tim segmentima miokarda se odvijaju procesi anaerobnog metabolizma sa posljedičnim oslobađanjem GP-BB u cirkulaciji [270,266]. Ovakva ishemija je potvrđena u značajnom procentu u prvom i tridesetom minutu nakon napora na našem uzorku vaterpolista i ona je bila u inverznoj korelaciji sa vrijednostima sistolnog krvnog pritiska. Kako

se ishemija povlačila tako se normalizovao i sistolni pritisak odnosno nema korelacija u šesdesetom minutu.

Korelacije GP-BB sa serumskim koncentracijama Mg

Serumske koncentracije Mg imaju značajan uticaj na KVS. Objavljivane su brojne studije u kojima je ukazano na udruženost promjena u koncentracijama Mg sa KVS oboljenjima. Dosta je izučavana povezanost serumskog Mg i krvnog pritiska [316,317]. U ARIC studiji je potvrđena negativna korelacija serumskih koncentracija Mg sa vrijednostima sistolnog krvnog pritiska [318]. Nedovoljne koncentracije serumskog Mg ili njegova narušena funkcija može da vodi u vazospazam i oštećenje endotela [319,320,321]. Mg može da štiti ćelije u toku ishemije i na taj način da limitira veličinu infarkta [322]. Izlaganje napornim treninzima kod sportista uslovljava preraspodjelu Mg u tijelu u skladu sa izmijenjenim metaboličkim potrebama [316]. Prateći efekat napornog treninga kod vaterpolista je da su serumske koncentracije Mg bile u direktnoj korelaciji sa koncentracijama GP-BB samo odmah nakon treninga u prvom minutu, ali ne i kasnije.

Korelacije GP-BB sa Hsp27

Na različitim animalnim modelima je ukazano da Hsp27 posjeduju protektivni efekat protiv ćelijskih i/ili tkivnih oštećenja [121,122]. Organizam profesionalnih sportista kroz redovne trenažne programe se praktično priprema na predstojeće napore, a jedan od mjerljivih parametara je povećanje bazalnih koncentracija Hsp-a. Hsp27 je snažan citoprotektivni protein koji je odgovoran za održavanje konformacije citoskeletnih proteina ćelija miokarda i za održavanje ćelijske homeostaze čime povećavaju sposobnost ćelija za preživljavanje u stanjima ishemije [296,297,298]. U odsustvu hipoksije oni djeluju kao molekularni pratioci kojima pripada značajna uloga u normalnom funkcionisanju ćelija. Intraćelijske koncentracije pozitivno koreliraju sa koncentracijama u serumu [153]. Izlaganje vaterpolista napornom treningu dovodi do porasta koncentracija GP-BB što je indikator postojanja hipoksije u ćelijama miokarda nakon treninga u prvom i tridesetom minutu. Ćelije miokarda vaterpolista odgovaraju svojim protektivnim djelovanjem kroz sintezu Hsp27, te su njihove serumske koncentracije bile u značajnim pozitivnim korelacijama u prvom i tridesetom minutu, ali ne i nakon šesdesetog minuta. Istovremeno Hsp27 je bio u značajnoj inverznoj korelaciji sa sistolnim pritiskom u

tridesetom i šesdesetom minuti kada ćelije miokarda i ćelije endotela krvnih sudova povrate morfološku i funkcionalnu homeostazu.

VII ZAKLJUČAK:

1. Vaterpolo sport uzrokuje adaptaciju u morfološkom izgledu tijela i u fiziologiji kardiovaskularnog i imunskog sistema.
2. Značajno veće serumske koncentracije GP-BB nakon treninga izdržljivosti, u prvom i tridesetom minutu, ukazuju da napor u vaterpolo sportu dovodi do metaboličkog iscrpljivanja ćelija miokarda obzirom da je GP-BB marker kontrolnih intraćelijskih metaboličkih mehanizama.
3. Metaboličko iscrpljivanje ćelija miokarda je reverzibilnog karaktera i serumske koncentracije GP-BB vraćaju se na referentne vrijednosti nakon šesdeset minuta.
4. Serumske koncentracije GP-BB su negativno korelisale sa vrijednostim sistolnog krvnog pritiska u prvom i tridesetom minutu nakon izlaganja napornom treningu ukazujući da se metabolička iscrpljenost ćelija reflektuje na kontraktilnost miokarda.
5. U prvom minutu nakon napornog treninga serumske koncentracije GP-BB i Mg su značajno pozitivno korelisale ukazujući na povećanu permeabilnost ćelija miokarda.
6. Stresogeno izlaganje prolongiranim napornim treninzima kod vaterpolista dovodi do povećanja bazalnih koncentracija kardioprotektivnog Hsp27 u serumu. Izlaganje napornom treningu uzrokuje opadanje serumskih koncentracija Hsp27 u prvom i tridesetom minutu nakon treninga što ukazuje na postojanje proteolitičkih aktivnosti u ćelijama miokarda.
7. Serumske koncentracije Hsp27 i GP-BB su značajno pozitivno korelisale u prvom i tridesetom minutu nakon izlaganja napornom treningu ukazujući na reverzibilnost nastalih oštećenja funkcionalnih proteina u ćelijama miokarda.
8. Serumske koncentracije Hsp27 elitnih vaterpolista su značajnim negativno korelisale sa sistolnim krvnim pritiskom u tridesetom i šesdesetom minutu nakon treninga ukazujući na reverzibilnost oštećenja strukturalnih i kontraktilnih proteina u ćelijama miokarda.
9. GP-BB i Hsp27 mogli bi da budu značajni indikatori u procjeni rizika i prevenciji nastajanja srčanih oštećenja kod vaterpolista, ali i kod sportista uopšte.

VIII LITERATURA

1. Nabršnigg, K., Janković, S., Knjaz, D. Iznenadna smrt tijekom i neposredno nakon sportske aktivnosti. Hrvatski športskomedicinski vjesnik.2009; 24: 3-19.
2. Mišigoj-Duraković M. Uloga tjeleovježbe u prevenciji kroničnih nezaraznih bolesti. Medicus 2000;1(9):99-104
3. Bramah S. Sudden cardiac death. Circulation 1999;100(22):2276-81
4. Libberthson RR. Sudden death from cardiac causes in children and young adults. N.Eng J Med 1996;334(16):1039-44
5. Sherman DL, Balady GJ.Exercise and physical activity. In: Topol EJ, editor.Textbook of cardiovascular medicine. Philadelphia:Lippincott-Raven;1997; pp 91-109
6. Siscovick DS, Weiss NS, Fletcher RH, Lasky T. The incidence of primary cardiac arrest during vigorous exercise. N Engl J Med 1984;311(14):874-7
7. Đurđević V. Sportsko srce. Beograd: “Sportska knjiga” 1981; pp 245-55
8. Wanzell RS. Decades of worksite fitness programmes. Sports Med 1994;17(5):324-37
9. Soni NR, Deanfield JE. Assessment of cardiovascular fitness for competitive sport in high risk groups. Arch Dis Child 1997; 77(5):386-9
10. Popović D, Mazić S, Šćepanović Lj, Aleksandrić B, Ostojić M. Incidencija iznenadne srčane smrti sportista. Med Pregl 2006;59(7-8):342-346
11. Mijailović Z, Stajić Z, Tavčiovski D, Matunović D. Iznenadna srčana smrt sportista. Med Pregl 2009; 62(1-2):37-41
12. Maron BJ, Thompson PD, Ackerman MJ. et al. Recommendations and considerations related to preparticipation screening for cardiovascular abnormalities in competitive athletes: 2007 update: a scientific statement from American Heart Association Council in Nutrition; Physical Activity and Metabolism: endorsed by American College of Cardiology Foundation. Circulation 2007; 115:1643-1655
13. Corrado D.et al. Does sports activity enhance the risk of sudden death in adolescents and young adults? Am Coll Cardiol 2003;11(42):1959-63

14. Ferreira M. et al. Sudden cardiac death athletes: a systematic review. *Sports Med Arthrosc Rehabil Ther Technol.* 2010; 2: 19.
15. Labar B. Sudden death in athletes. *International Conference on Injuries in Water Polo; Book of Abstracts 2010*; pp 16-19
16. Mitchell JH, Haskell W, Snell P, Van Camp SP. Task Force 8: Classification of sports. *J Am Coll Cardiol* 2005;45(8):1364-67
17. Mitchell JH, Haskell WL, Raven PB. Classification of sports. *Med Sci Sport Exerc* 1994;26(10):S242-5
18. Maron BJ, Araujo CGS, Thompson PD, Fletcher GF. et al. Recommendations for preparticipation screening and the assessment of cardiovascular disease in master athletes: an advisory for healthcare professionals from the working groups of the World Heart Federation, the International Federation of sports medicine, and the American Heart Association Committee on exercise, cardiac rehabilitation, and prevention. *Circulation* 2001;103(2):327-34
19. Corrado DI, Pelliccia A, Bjornstad HH, et al. Cardiovascular pre-participation screening of young competitive athletes for prevention of sudden death: proposal for common European protocol. Consensus statement of the study group of sport cardiology of the working group of cardiac rehabilitation and exercise physiology and the working group of myocardial and precordial diseases of the European society of cardiology. *Eur Heart J* 2005;26(5):516-24
20. Mair T. Tissue release of cardiac markers: from physiology to clinical applications. *Clin Chem Lab Med* 1999;37(11/12):1077-84
21. Jennings RB, Reimer KA. The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annu Rev Med* 1991;42:225-46
22. Piper HM, Schwartz P, Spahr R, et al. Early enzyme release from myocardial cells is not due to irreversible cell damage. *J Mol Cell Cardiol* 1984;16(4):385-8
23. Wiene W, Kammermeier H. Intra- and extracellular markers in interstitial transudate of perfused rat heart. *Am J Physiol* 1988;254(4Pt2):H785-94
24. Heyndrickx GR, Amano J, Kenna T, et al. Creatine kinase release not associated with myocardial necrosis after short periods of coronary artery occlusion in conscious baboons. *J Am Coll Cardiol* 1985;6(6):1299-303

25. Michael LH, Hunt JR, Weilbach D. Creatine kinase and phosphorylase in cardiac lymph: coronary occlusion and reperfusion. *Am J Physiol* 1985;248(3Pt2):350-9
26. Ramppis A, Scheffold T, Greten J, et al. Intracellular compartmentation of troponin T: release kinetics after global ischemia and calcium paradox in the isolated perfused rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 1995;27(2):793-803
27. Spiekermann PG, Nordbeck H, Preusse CJ. From heart to plasma. In: Hearse DJ, De Leiris J (eds). *Enzymes in cardiology: diagnosis and research*. New York John Wiley 1979; pp 59-79
28. Hermens WT. Mechanisms of protein release from injured heart muscle. In: Kaski JC, Holt DW (eds). *Myocardial damage: early detection by novel biochemical markers*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers 1998; pp 85-98
29. Sunnergren KP, Rovetto MJ. Microvascular permeability characteristics of isolated perfused ischemic rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 1980;12(10):1011-31
30. Dauber IM, VanBenthuyzen KM, McMurty IF, et al. Functional coronary microvascular injury evident as increased permeability due to brief ischemia and reperfusion. *Circ Res* 1990;66(4):986-98
31. La Due JS, Wroblewski F, Karmen A. Serum glutamic oxaloacetic transaminase activity in human acute transmural myocardial infarction. *Science* 1954;120:497-99
32. Kemp M, Donovan J, Higham H, Hooper J. Biochemical markers of myocardial injury. *Brit J of Anest* 2004;93(1):63-73
33. Grande P, Hansen BF, Christiansen C, Naestof J. Estimation of acute myocardial infarct size in man by serum CKMB measurements. *Circulation* 1982;65(4):756-64
34. Azzazy HME, Christenson RH. Cardiac markers of acute coronary syndromes: is there a case for point-of-care testing? *Clin Biochem* 2002;35(1):13-27
35. Wu AH, Apple FS, Gibler WB, Jesse RL, Warshaw MM, Valdes R Jr. National Academy of Clinical Biochemistry Standards of Laboratory Practice: recommendations for the use of cardiac markers in coronary artery disease. *Clin Chem* 1999;45(7):1104-21
36. Christenson RH, Duh SH, Sanhai WR, Wu AH, Holtamn V, Painter P, et al. Characteristics of an albumin cobalt binding test for assessment of acute coronary syndrome patients: a multicenter study. *Clin Chem* 2001;47(3):464-70

37. Alhadi HA, Fox KA. Do we need additional markers of acute myocyte necrosis: the potential value of heart fatty-acid-binding protein. *QJM* 2004;97(4):187-98
38. Rabitzsch G, Mair J, Lechleitner P, Noll F, Hofmann U, Krause EG, et al. Immunoenzymometric assay of human glycogen phosphorylase isoenzyme BB in diagnosis of ischemic myocardial injury. *Clin Chem* 1995;41(7):966-78
39. Newgard C, Hwang P, Fletterick R. The family of glycogen phosphorylases: structure and function. *Critical Rev in Biochem and Molec Biology* 1989;24(1):69-99
40. Johnson IN. Glycogen phosphorylase: control by phosphorylation and allosteric effectors. *The FASEB J* 1992;6(6):2274-82
41. Krebs EG, Fischer EH. The phosphorylase b to a converting enzyme of rabbit skeletal muscle. *Bochem Biophys Acta* 1956;20(1):150-7
42. Krebs EG. The enzymology of control by phosphorylation. In: *The Enzymes* (Boyer PD and Krebs EG) 3rd ed. 1986; 17:3-20
43. Majkić-Singh N. Izbor biohemijskih pokazatelja za dijagnostifikovanje akutnog koronarnog sindroma. *Jugoslav Med Biochem* 2005;24(1):1-13
44. Browner MF, Fletterick RJ. Phosphorylase: a biological transducer. *Trends in Biochemical Science* 1992;17(2):66-71
45. Fletterick RJ, Sprang RS. Glycogen phosphorylase structures and function. *Acc Chem Res* 1982;15(11):361-9
46. Madsen NB, Kasvinsky PJ, Fletterick RJ. Allosteric transition of phosphorylase a and the regulation of glycogen metabolism. *J Biol Chem* 1978;253(24):9097-101
47. Goodsell DS. Looking at the molecules-an essay on art and science. *Chembiochem* 2003;4(12):1293-8
48. Gaussin V, Gailly P, Gillis JM, Hue L. Fructose-induced increase in intracellular free Mg²⁺ ion concentration in rat hepatocytes: relation with the enzymes of glycogen metabolism. *Biochem J* 1997;326(Pt3):823-7
49. Wosilait WD, Sutherland EW. The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase. II. Enzymatic inactivation of liver phosphorylase. *J Biol Chem* 1956;218(1):469-81
50. Henion WF, Sutherland EW. Immunological differences of phosphorylase. *J Biol Chem* 1957;224(1):477-88

51. Davis CH, Schliselfeld LH, Wolf DP, Levitt CA, Krebs EG. Interrelationships among glycogen phosphorylase isoenzyme. *J Biol Chem* 1967;242(20):4824-33
52. Takeo K, Nakamura S. Dissociation constant of glucan phosphorylase studied by polyacrilamide gel disc electrophoresis. *Arch Biochem Biophys* 1972;153(1):1-7
53. Proux D, Dreyfus JC. Phosphorylase isoenzyme in tissue: prevalence of the liver type in man. *Clin Chem Acta* 1973;48(2):167-72
54. Satoh K, Imal F, Sato K. A new glycogen phosphorylase present in rat tissues containing the brain type isoenzyme. *FEBS let.* 1978;95(2):239-42
55. Richter F, Bohme HJ, Hofmann. Developmental changes of glycogen phosphorylase b isoenzyme in rat tissues. *Biomed Biochim Acta* 1983;42(10):1229-35
56. David ES, Crerar MM. Quantitation of muscle glycogen phosphorylase mRNA and enzyme amounts in adult rat tissues. *Biochim Biophys Acta* 1986;880(1):78-90
57. Burke J, Hwang PK, Fletterick RJ. Intron/exon structure of the human gene for the muscle isoenzyme of glycogen phosphorylase. *Proteins* 1987;2(3):177-87.
58. Newgard CB, Nakano K, Hwang PK, Fletterick RJ. Sequence analysis of the cDNA encoding human liver glycogen phosphorylase reveals tissue-specific codon usage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83(21):8132-6
59. Newgard CB, Littman DR, van Genderen C, Smith M, Fletterick RJ. Human brain glycogen phosphorylase: cloning, sequence analysis, chromosomal mapping, tissue expression, and comparison with the human liver and muscle isoenzymes. *J Biol Chem* 1988;263(8):3850-7
60. Graves DJ, Wang JH. A glucan phosphorylase-chemical and physical basis of catalysis and regulation. In: *The Enzymes* (Boyer PD ed) 3rd ed, 1972;7:435-482
61. Madsen NB. Glycogen phosphorylase: control by phosphorylation. In: *The Enzymes* (Boyer PD ed) 3rd ed, 1972;17:366-394
62. Johnson LN, Hajdu J, Acharya KR, Stuart DI. Glycogen phosphorylase b. In: *Allosteric Enzymes* (Herve G ed) 1989; pp81-127
63. Palm D, Klein HW, Schinzel R, Buehner M, Helmreich EJM. The role of pyridoxal 5'-phosphate in glycogen phosphorylase catalysis. *Biochemistry* 1990;29(5):1099-107

64. Oikonomakos NG, Acharaya K, Johnson LN. Rabbit muscle glycogen phosphorylase b; the structural basis of activation and control. In: Post-translational modification of proteins (Crabbe J and Harding J ed) 1992; pp81-151
65. Bahnak BR, Gold AH. Effects of alloxan diabetes on the turnover of rat liver glycogen synthase. Comparison with liver phosphorylase. *J Biol Chem* 1982;257(15):8775-80
66. Michael LH, Hunt JR, Weilbaecher D, Perryman MB, Roberts R, Entman NL. Creatine kinase and phosphorylase in cardiac lymph: coronary occlusion and perfusion. *Am J Physiol* 1985;248(3 Pt 2):H350-9
67. Krause EG, Harwing A, Rabitzsch G. On the release of glycogen phosphorylase from heart muscle: effect of substrate depletion, ischemia and imipramine. *Biomed Biochim Acta* 1989;48(2-3):S77-82
68. Kato A, Shimuzu A, Kurobe N, Takashi M, Koschikawa K. Human brain-type glycogen phosphorylase: quantitative localization in human tissue determined with an immunoassay system. *J Neurochem* 1989;52(5):1425-32
69. Meyer F, Heilmeyer LMG Jr, Haschke RH, Fischer EH. Control of phosphorylase activity in muscle glycogen particle. 3.Regulation of phosphorylase phosphatase. *J Biol Chem* 1970;245(24):6657-63
70. Entman ML, Kanike K, Goldstein MA, Nelson TE, Bornet EP, Futch TW, Schwartz A. Association of glycogenolysis with cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1976;251(10):3140-6
71. Entman ML, Bornet EP, van Winkle WB, Goldstein MA, Schwartz A. Association of glycogenolysis with cardiac sarcoplasmic reticulum: II Effect of glycogen depletion, deoxycholate solubilisation and cardiac ischemia: evidence for phosphorylase kinase membrane complex. *J Mol Cell Cardiol* 1977;9(7):515-28
72. Lees SJ, Frank PD, Spangenburg EE, Williams JH. Glycogen and glycogen phosphorylase associated with sarcoplasmic reticulum: effects of fatiguing activity. *J Appl Physiol* 2001;91(4):1638-44
73. Cuenda A, Nogues M, Henao F, Gutierrez-Marino C. Interaction between glycogen phosphorylase and sarcoplasmic reticulum membranes and its functional implications. *J Biol Chem* 1995;273(20):11998-12004

74. Neely JR, Grotyohann LW. Role of glycolytic products in damage to myocardium: dissociation of adenosine triphosphate levels and recovery of function of reperfused canine myocardium. *Circ Res* 1984;55(6):816-24
75. Stanley WC, Hall JL, Stone CK, Hacker TA. Acute myocardial ischemia causes a transmural gradient in glucose extraction but not glucose uptake. *Am J Physiol* 1992;262(81 Pt 2):H91-6
76. McElroy DD, Walker WE, Taegmeyer H. Glycogen loading improves left ventricular function of the rabbit heart after hypothermic ischemic arrest. *J Appl Cardiol* 1989;4:455-65
77. Cross HR, Opie LH, Radda GK, Clarke K. Is a high glycogen content beneficial or detrimental to the ischemic rat heart?: a controversy resolved. *Circ Res* 1996;78(3):482-91
78. Taegmeyer H. Glycogen in the heart-an expanded view. *J Mol Cell Cardiol* 2004;37(1):7-10
79. Gutierrez-Correa J, Hod M, Passonneau JV. Glycogen and enzymes of glycogen metabolism in rat embryos and fetal organs. *Biol Neonate* 1991;59(5):294-302
80. Krause SM, Hess ML. Characterisation of cardiac sarcoplasmic reticulum dysfunction during short-term normothermic global ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 1985;17(5):523-6
81. Hess ML, Krause SM, Robbins AD, Greenfield LJ. Excitation-contraction coupling in hypothermic ischemic myocardium. *Cardiovasc Res* 1981;15(7):390-7
82. Van De Vusse GJ, Reneman RS. Glycogen and lipids (endogenous substrates). In: Drake-Holland AJ, Noble MIM eds. *Cardiac Metabolism*. New York: Wiley 1983; pp215-237
83. Camici P, Ferrannini E, Opie LH. Myocardial metabolism in ischemia heart disease: basic principles and application to imaging by positron emission tomography. *Prog Cardiovasc Dis* 1989;32(3):217-38
84. Depre C, Rider MH, Hue L. Mechanisms of control of heart glycolysis. *Eur J Biochem* 1998;258(2):277-90
85. Mair J, Laure C, Mair P, Balogh D, Calzolari C, Purchendorf B. Use of cardiac troponin I to diagnose perioperative myocardial infarction in coronary artery bypass grafting. *Clin Chem* 1994;40(11 Pt 1):2066-70

86. Lang K, Borner A, Figulla HR. Comparison of biochemical markers for detection of minimal myocardial injury: superior sensitivity of cardiac troponin-T ELISA. *J of Intern Med* 2000;247(1):119-23
87. Peetz D, Post F, Schnizel H, Schweigert R, Schollmayer C, Steinbach K, Dati F, Noll F, Lakner KJ. Glycogen phosphorylase BB in acute coronary syndromes. *Clin Chem Lab Med* 2005;43(12):1351-8
88. Hauser M, Bengel FM, Kuhn A, Sauer U, Zylla S, Braun SL, Nekolla SG, Oberhoffer R, Lange R, Schwaiger M, Hess J. Myocardial blood flow and flow reserve after coronary reimplantation in patients after arterial switch and ross operation. *Circulation* 2001;103(14):1875-80
89. Pudil R, Vasatova M, Lenco J, et al. Plasma glycogen phosphorylase BB is associated with pulmonary artery wedge pressure and left ventricle mass index in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Clin Chem Lab Med* 2010;48(8):1193-5
90. ElGhandour AH, ElSorady M, Azab S. Human heart-type fatty-binding protein as an early diagnostic marker of doxorubicin cardiac toxicity. *Hematol Rev* 2009;1(1):29-32
91. Horacek JM, Vasatova M, Tichy M, Pudil R, Jebavy L, Maly J. The use of cardiac biomarkers in detection of cardiotoxicity associated with conventional and high-dose chemotherapy for acute leukemia. *Exp Incol* 2010;32(2):97-9
92. Lin LX, Mao QH, Zhang ZL, An CX, Kang XG. Plasma levels of N-terminal pro-brain natriuretic peptide and glycogen phosphorylase isoenzyme BB in neonates with asphyxia complicated by myocardial injury. *Chin J Contemp Pediatr* 2010;12(4):252-55
93. Lindquist S. The heat-shock response. *Annu Rev Biochem* 1986;55:1151-91
94. Ritossa F. A new puffing pattern induced and temperature shock in DNP in *Drosophila*. *Experientia* 1962;18:571-3
95. Moran L, Mirault ME, Arrigo AP, Goldschmidt-Clermont M, Tissieres A. Heat shock of *Drosophila melanogaster* induces the synthesis of new messenger RNAs and proteins. *Philos Trans R Soc London B Biol Sci* 1978;283(997):391-406
96. Noble EG, Milne KJ, Melling CWJ. Heat shock proteins and exercise: a primer. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2008;33(5):1050-65

97. Pockley AG, Georgiades A, Thulin T, de Faire U, Frostegard J. Serum heat shock protein 70 levels predict the development of atherosclerosis in subjects with established hypertension. *Hypertension* 2003;42(3):235-8
98. Whitley D, Goldberg SP, Jordan WD. Heat shock proteins: a review of molecular chaperons. *J Vasc Surg* 1999;29(4):748-51
99. Beckman RP, Mizzen LE, Welch WJ. Interaction of Hsp 70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. *Science* 1990;248(4957):850-4
100. Calderwood SK, Mambula SS, Dray PJ, Theriault JR. Extracellular heat shock proteins in cell signaling and immunity. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1113:28-39
101. Csermely P, Soti C, Balth GL. Chaperones as parts of cellular networks. *Adv Exp Med Biol* 2007;594:55-63
102. Chen Y, Voegeli TS, Liu PP, Noble EG, Currie RW. Heat shock paradox and a new role of heat shock proteins and their receptors as anti-inflammation targets. *Inflamm, Allergy Drug Targets* 2007;6(2):91-100
103. Johnson JD, Fleshner M. Releasing signals, secretory pathways, and immune function of endogenous extracellular heat shock protein 72. *J Leukoc Biol* 2006;79(3):425-434
104. Malaitsev VV, Bogdanova IM, Makarova OV. Heat shock proteins and their role in the development of pathological processes. *Arkh Patol* 2008;70(6):31-8
105. Cornelussen RN, Vanagt WY, Prinzen FW, Snoeckx LH. Proteins involved in salvage of myocardium. *Adv Exp Med Biol* 2003;543:277-91
106. Kampinga HH, Henning RH, van Gelder IC, Brundel BJ. Heat shock proteins and atrial fibrillation. *Cell Stress Chaperones* 2007;12(2):97-100
107. Schmitt E, Gehrman M, Brunet M, Mulhoff G, Garrido C. Intracellular and extracellular function of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *J Leukoc Biol* 2006;81(1):15-27
108. Neuer A, Spandorfer SD, Giraldo P, Dietrle S, Rosenwaks Z, Witkin SS. The role of heat shock proteins in reproduction. *Human Reprod Update* 2000;6(2):149-59
109. Easton DP, Kaneko Y, Subjeck JR. The Hsp10 and Grp1 70 stress proteins: newly recognised relatives of the Hsp70s. *Cell Stress Chaperones* 2000;5:276-290

110. Picard D. Chaperoning steroid hormone action. *Trends Endocrinol Metab.* 2006;17:229-235
111. Zou J, Guo Y, Guettouche T, Smith DF, Voelmy R. Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1. *Cell* 1998;94:471-480
112. Little E, Ramakrishnan M, Roy B, Gazit G, Lee AS. The glucose-regulated proteins (GRP78 and GRP94): function, gene regulation and applications. *Crit Rev Eukaryot.* 1994;4:1-18
113. Morimoto RI, Tissieres A, Gerogeopoulos C. The biology of heat shock proteins and molecular chaperones. Colg Spring Harbor Laboratory Press, Woodbury N.Y. 1994
114. Voegeli TS, Wintink AJ, Currie RW. Heat shock proteins 27 and 70 regulating angiotensin II-induced NF- κ B: a possible connection to blood pressure control? *Appl Physiol Nutr Metab* 2008;33(5):
115. Gabai VL, Meriin AB, Yaglom JA, Volloch VZ, Sherman MY. Role of Hsp70 in regulation of stress-kinase JNK: implications in apoptosis and aging. *FEBS Lett.* 1998;438:1-4
116. Hood DA. Invited review: contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 2001;90:1137-1157
117. Arya R, Mallik M, Lakhotia SC. Heat shock genes-integration cell survival and death. *J Biosci* 2007;32:595-610
118. Zanin-Zhorov A, Bruck R, Tal G, Oren S, Aeed H, Hershokoviz R. Heat shock protein 60 inhibits Th1-mediated hepatitis model via innate regulation of Th1/Th2 transcription factors and cytokines. *J Immunol.* 2005;174:3227-3236
119. Maines MD. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1997;37:517-554
120. Vicart P, Caron A, Guicheney P, Li Z, Prevost MC, Faure A. A missense mutation in the alphaB-crystalline chaperone gene causes a desmin-related myopathy. *Nat Genet* 1998;20:92-95
121. Hendrick JP, Langer T, Davis TA, Harti FU, Wiedmann M. Control of folding and membrane translocation by binding of the chaperone DnaJ to nascent polypeptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90(21):10216-20

122. Kampinga HH, Hageman J, Vos MJ, Kubota H, Tanguay RM, Bruford EA, Cheetman ME, Chen B, Hightower LE. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress and Chaperones* 2009;14(1):105-11
123. Wheeler DL, Barrett T, Benson DA. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res* 2008;36(database issue):D13-21
124. Arrago AP, Suhan JP, Welch WJ. Dynamic changes in the structure and intracellular locale of the mammalian low-molecular-weight heat shock protein. *Mol Cell Biol* 1988;8(12):5059-71
125. MacRae TH. Structure and function of small heat shock/alpha-crystallin proteins: established concepts and emerging ideas. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2000;57(6):899-913
126. Van Morntfort R, Slingsby C, Vierling E. Structure and function of the small heat shock protein/alpha-crystallin family of molecular chaperones. *Adv Protein Chem* 2001;59:105-56
127. Gusev NB, Bogatcheva NV, Marston SB. Structure and properties of small heat shock proteins (sHsp) and their interaction with cytoskeleton proteins. *Biochemistry (Moscow)* 2002;67(5):11-9
128. Sugiyama Y, Suzuki A, Kishikawa M, Akutusu R, Hirose T, Wayne MMY, Tsui SKW, Yoshida S, Ohno S. Muscle develops a specific form of small heat shock protein complex composed of MKBP/HSPB2 and HSPB3 during myogenic differentiation. *J Biol Chem* 2000;275(2):1095-104
129. Laundry J, Lambert H, Zhou M, Lavoie JN, Weber LA, Anderson CW. Human HSP27 phosphorylated at serines 78 and 82 by heat shock and mitogen-activated kinases that recognize the same amino acid motif as S6 kinase II. *J Biol Chem* 1992;267(2):794-803
130. Kim KK, Kim R, Kim S. Crystal structure of a small heat shock protein. *Nature* 1998;394(6693):595-9
131. Ciocca DR, Oestereich S, Chamness GC, McGuire WL, Fuqua SA. Biological and clinical implications of heat shock protein 27,000 (Hsp27): a review. *J Natl Cancer Inst* 1993;85(19):1570-88

132. Trivedi V, Gadhvi P, Chorawala M, Shah G. Role of the heat shock protein in immune response and immunotherapy for human cancer. *Int J Pharm Sci Rev an Res* 2010;2(2):57-62
133. Sarto C, Binz PA, Mocarelli P. Heat shock proteins in human cancer. *Electrophoresis* 2000;21(6):1218-26
134. Parcellier E, Schmitt E, Gurbuxani S, Seigneurin-Berny D, Pance A, Chantome A, Plenchette S, Khochbin S, Solary E, Garrido C. Hsp27 is ubiquitin-binding protein involved in I-kappaBalpha proteasomal degradation. *Mol Cell Biol* 2003;23(16):5790-802
135. Haslbeck M. sHSP and their role in the chaperon network. *Cell Mol Life Sci* 2002;59(10):1649-57
136. Theriault JR, Lambert H, Chavez-Zobel AT, Charest G, Lavigne P, Laundry J. Essential role of the NH₂-terminal WD/EPF motif in the phosphorylation-activated protective function of mammalian Hsp27. *J Biol Chem* 2004;279(22):23463-71
137. Rogalla T, Ehrnsperger M, Preville X, Kotlyarov A, Lutch G, Ducasse C, Paul C, Wieske M, Arrigo AP, Buchner J, Gaestel M. Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperon function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor alpha by phosphorylation. *J Biol Chem* 1999;274(27):18947-56
138. Gaestel M. sHSP-phosphorylation enzymes, signaling pathways, and functional implications. In: *Progress in molecular and subcellular biology* 2002; pp151-69
139. Lambert H, Charette SJ, Bernier AF, Guimond A, Laundry J. HSP27 multimerisation mediated by phosphorylation-sensitive intermolecular interactions at the amino terminus. *J of Biol Chem* 1999;274(14):9378-85
140. Kato K, Ito H, Inuguma Y. Expression and phosphorylation of mammalian small heat shock proteins. In: *Progress in molecular and subcellular biology* 2002; pp129-50
141. Arata S, Hamaguchi S, Nose K. Inhibition of colony formation of NIH 3T3 cells by the expression of the small molecular weight heat shock protein HSP27: involvement of its phosphorylation and aggregation at the C-terminal region. *J Cell Physiol* 1997;170(1):19-26
142. Mehlen P, Mehlen A, Gulliet D, Preville X, Arrigo AP. Tumor necrosis factor-alpha induces changes in the phosphorylation, cellular localization, and oligomerization

- of human hsp27, a stress protein that confers cellular resistance to this cytokine. *J Cell Biochem* 1995;58(2):248-5
143. Benjamin IJ, McMillan DR. Stress (heat shock) proteins: molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 1998;83(2):117-32
 144. Black SC, Lucchesi BR. Heat shock proteins in the ischemic heart: an endogenous, protective mechanism (editorial comment). *Circulation* 1993;87(3):1048-51
 145. Welch IJ, Kang HS, Beckmann RP, Mizzen LA. Response of mammalian cells to metabolic stress: changes in cell physiology and structure/function of stress proteins. *Curr Top Microbiol Immunol* 1991;167:31-55
 146. Laszlo A. The thermoresistant state: protection from initial damage or better repair? *Exp Cell Res* 1992;202(2):519-31
 147. Hargrove JL, Schmidt FH. The role of mRNA and protein stability in gene expression. *FASEB J* 1989;3(12):2360-70
 148. Lindquist S, Craig EA. The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* 1988;22:631-77
 149. Theodorakis NG, Morimoto RI. Posttranscriptional regulation of hsp70 expression in human cells: effects of heat shock, inhibition of protein synthesis and adenovirus infection on translation and mRNA stability. *Mol Cell Biol* 1987;7(12):4357-68
 150. Karmazyn M, Mailer K, Currie RW. Acquisition and decay of heat shock-enhanced postischemic ventricular recovery. *Am J Physiol* 1990;259(2 pt 2):H424-31
 151. Mocanu MM, Steare SE, Evans MC, Nugent JH, Yellon DM. Heat stress attenuates free radical release in the isolated perfused rat heart. *Free radic Biol Med* 1993;15(4):459-63
 152. Ferns G, Shams S, Shafi S. Heat shock protein 27: its potential role in vascular disease. *Int J Exp Pathol* 2006;87(4):253-74
 153. Szerafin T, Hoetzenecjer K, Hacker S, Horvath A, Pollreisz A, Arpad P, Mangold A, Wluszczak T, Dworschak M, Seitelberger R, Wolner E, Ankersmith HJ. Heat shock proteins 27, 60, 70, 90 α and 20S proteasome in On-pump versus Off-pump coronary artery bypass graft patients. *Ann Thorac Surg* 2008;85:80-8

154. Dohke T, Wada A, Isono T, Fujii M, Yamamoto T, Tsutamoto T, Horie M. Proteomic analysis reveals significant alternations of cardiac small heat shock protein expression in congestive heart failure. *J Card Fail* 2006;12(1):77-84
155. Efthymiou CA, Mocanu MM, de Belleruche J, Wells DJ, Latchmann DS, Yellon DM. Heat shock protein 27 protects the heart against myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* 2004;99(6):392-4
156. Martin JL, Maestril R, Hilal-Dandan R, Brunt LL, Dillmann WH. Small heat shock proteins and protection against ischemic injury in cardiac myocytes. *Circulation* 1997;96(12):4343-8
157. Venkatakrishnan CD, Tewari AK, Moldovan L, Cardounel AJ, Zweier JL, Kuppusamy P, Ilagovan G. Heat shock protects cardiac cells from doxorubicin-induced toxicity by activating p38MAPK and phosphorylation of small heat shock protein 27. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291(6):H2680-91
158. De Souza AI, Wait R, Mitchell AG, Banner NR, Dunn MJ, Rose ML. Heat shock protein 27 is associated with freedom from graft vasculopathy after human cardiac transplantation. *Circ Res* 2005;97(2):192-8
159. Martin-Ventura JL, Duran MC, Blanco-Colio LM. Identification by differential proteomic approach of heat shock protein 27 as a potential marker of atherosclerosis. *Circulation* 2004;110(15):2216-19
160. Kardys I, Rifai N, McIlhac O. Plasma concentration of heat shock protein 27 and risk of cardiovascular disease: a prospective, nested case-control study. *Clin Chem* 2008;54(1):139-46
161. Martin-Ventura JL, Nicolas V, Houard X, Blanco-Colio LM, Leclercq A, Egido J. Biological significance of decrease HSP27 in human atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26(6):1337-43
162. Rayner K, Chen YX, McNulty M. Extracellular release of the atheroprotective heat shock protein 27 is mediated by estrogen and competitively inhibits acLDL binding scavenger receptor A. *Circ Res* 2008;104(2):133-41
163. Dana A, Skarli M, Papakrivopoulou J. Adenosine A1 receptor induced delayed precognition in rabbits. Induction of p38MAPK activation and Hsp27 phosphorylation via a tyrosine kinase and PKC-dependent mechanism. *Circ Res* 2000;86(9):989-97

164. Sanda S, Kitakaze M, Papst PJ. Role of phasic dynamism of p38MAPK activation in ischemic preconditioning of the canine heart. *Circ Res* 2001;88(2):175-80
165. Xu Q. Role of heat shock proteins in atherosclerosis. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 2002;22(10):1547-59
166. Jozefiwich-Okonkwo G, Wierbowska-Drabik K, Kasielski M, Trzos E, Goraca A, Kaprzak J, Krzeminska-Pakuta M. Is Hsp27 a marker of myocardial ischemia? *Kardiol Pol* 2009;67(9):947-52
167. Platanou T. cardiovascular and metabolic requirements of water polo. *Serbian J of Sports Sci* 2009;3(3):85-97
168. Smith HK. Applied physiology of water polo. *Sports Med* 1998;26(5):317-34
169. Van der Wende K. The effects of game-specific task constraints on the outcome of water polo shot. Doctoral thesis. New Zealand: Auckland University of Technology 2005; pp 31-35
170. Hofmann A, Frase R. Analysis of Swimming Speed and Energy Metabolism in Competitive Water Polo Games. In: Maralen D. et al, eds *Swimming Science VI: Biomechanics and Medicine in Swimming*. London: E&FN Sport 1992; pp 313-9
171. Snyder P. Physiological, Physiological and Medical Aspects of Water Polo. In: *Water Polo for Players and Teachers of Aquatics*. 2008: pp 19
172. Lozovina V, Pavičić L. Antropometric changes in elite male water polo players: Survey in 1980 and 1995. *Croat Med J* 2004;45(2):202-5
173. Norton K, Olds T. Morphological evolution of athletes over 20th century: causes and consequences. *Sports Med* 2001;31(11):763-83
174. Johnston FE. Enviromental constraints on growth: extent and significance. In: Hauspie R, Lindgren G, Falkner F, eds. *Essays on auxology presented to James Mourilyan Tanner*, London: Caestelmed Publcitations; 1995; pp 402-13
175. Vila H, Ferragut C, Argudo FM, et al. Relationship between anthropometric parameters and throwing velocity in water polo players. *J Hum Sport Exerc* 2009;1(4):57-68
176. Mazza J, Ackland T, Bach T, Cosolito P. Absolute body size. In: Carter Jel, Arkland Tr (eds), *Kinantropometry in acquatic aports: a study of world class athletes* 1994; pp 15-54

177. Wilmore J. Body composition in sport and exercise: Direction for future research. *Med and Sci in Sports and Exerc* 1983;15(1):21-30
178. Avlinitou E. Energy requirements and training considerations in competitive water polo games. Paper presented at the First Water Polo Coaches seminar Athens 1991.
179. Cazorla G, Montpetit R. Metabolic and cardiac responses of swimmers, modern pentathletes, and water polo players during freestyle swimming to a maximum. In: Ungerechts B, Wilke K, Reischle K (eds). *Swimming Science V. Human Kinetics, Champaign IL* 1988; pp 251-57
180. Dlin R, Dotan R, Inbar O, Rostein A, Jacobs I, Karlsson J. Exaggerated systolic blood pressure response to exercise in water polo team. *Med Sci Sports Exerc* 1984;16(3):294-98
181. Jovanović J, Jovanović M. Krvni protosak, frekvencija srčanog rada i lipidni status kod profesionalnih vaterpolista i rukometaša. *Med Pregl* 2005;58(3-4):168-74
182. Unverdorben M, Kolb M, Bauer I, Bauer U, Brune M, Benes KE, et al. Cardiovascular load of competitive golf in cardiac patients and healthy controls. *Med Sci Sports Exerc* 2000;32(10):1674-8
183. Uusitalo AI, Uusitalo AJ, Rusko HK. Heart rate and blood pressure variability during heavy training and overtraining in the female athletes. *Int J Sports Med* 2000;21(1):45-53
184. Aubert AE, Beckers F, Ramackers D. Short-term heart rate variability in young athletes. *J Cardiol* 2001;37(1):85-8
185. Wilde AD, Ell SR. The effect on nasal resistance of an external nasal splint during isometric and isotonic exercise. *Clin Otolaryngol* 1999;34(5):414-6
186. Baum K, Ruther T, Essfeld D. Reduction of blood pressure response during strength training through intermittent muscle relaxations. *Int J Sports Med* 2003;24(6):441-5
187. Blanco M, Gomez J, Blanco G, Negrin C, Velasco M. Attenuated meclpromide induced vascular hyperreactivity to cold stress in athletic subjects. *Am J Ther* 1998;5(6):365-8
188. Ituku H, Shiraishi Y. Assessment of cardiovascular regulation during head-up tilt and suppression in swimmers. *Med Sci Sports Exerc* 2004;36(1):55-9

189. Holmer I. Oxygen uptake during swimming in man. *J Appl Physiol* 1972;33(4):502-15
190. McArdle WD, Glaser RM, Magel JR. Metabolic and cardiorespiratory response during free swimming and treadmill walking. *J Appl Physiol* 1971;30(5):733-42
191. Bergamn SA, Campbell JK, Wildenthal K. Diving reflex in man. Its relation to isometric and dynamic exercise. *J Appl Physiol* 1972;33(1):27-35
192. Rowell IB, Murray JA, Brengelmann GL, Kraining KK. Human cardiovascular adjustment to rapid changes in skin temperature during exercise. *Circ Res* 1969;24(5):711-21
193. Babbette M, Pluim AH, Zwinderman A, van der Laarse A, van der Wall EE. The athletes heart: a meta-analysis of cardiac structure and function. *Circulation* 2000;101(3):336-44
194. Pelliccia A, Maron BJ. Outer limits of the athletes heart: the effect of gender and relevance to the differential diagnosis with primary cardiac diseases. *Cardiol Clin* 1997;15(3):381-96
195. Morganroth j, Maron BJ, Henry WL, Epstein SE. Comparative left ventricular dimension in trained athletes. *Ann Intern Med* 1975;82(4):521-24
196. Basilico FC. Cardiovascular disease in athletes. *Am J Sports Med* 1999;27(1):108-21
197. Morgan HE, Baker KM. Cardiac Hypertrophy. Mechanical, neural and endocrine dependence. *Circulation* 1991;83(1):13-25
198. Maron BJ. Structural features of the athlete heart as defined by echocardiography. *J of Am Coll of Cardiol* 1986;7(1):190-203
199. Huston TP, Puffer JC, Rodney WM. The athletic heart syndrome. *New Engl J of Med* 1985;313(1):24-32
200. Shapiro LM. Physiological left ventricular hypertrophy. *Brit Heart J* 1984;52(2):130-5
201. Blomquist CG, Saltin B. Cardiovascular adaptations to physical training. *Ann Rev of Physiol* 1983;45:169-89
202. Hollman W, Rost R, Meirlir K, Liesen H, Heck H, Mader A. Cardiovascular effects of extreme physical training. *Acta Med Scand* 1986;711:193-203

203. Hayashi T. Echocardiographic and electrocardiographic measures in obese children after an exercise program. *Int J Obesity* 1987;11(5):465-72
204. Medved R, Fabičić-Sabadi V, Medved V. Echocardiographic findings in children participating in swimming training. *Int J Sports Med* 1986;7(2):94-99
205. Caso P, D'Andrea A, Galderisi M, Liccardo B, Severino S, De Simone L, Izzo A, D'Andrea L, Minnini N. Pulsed doppler tissue imaging in endurance athletes: relation between left ventricular preload and myocardial regional diastolic function. *Am J Cardiol* 2000;85(9):1131-6
206. Patterson SW, Starling H. On the mechanical factors which determine the output of the ventricles. *J Physiol* 1914;48(5):357-79
207. Scharhag J, Schneider G, Urhausen A, Rochette V, Kramann B, Kindermann W. Right and left ventricular mass and function in male endurance athletes and untrained individuals determined by magnetic resonance imaging. *J Am Coll Cardiol* 2002;40(10):1856-63
208. Simonson SR, Jakson CGR. Leucocytosis occurs in response to resistance exercise in men. *J Strength and Cond Res* 2004;18(2):266-71
209. Natale VM, Brenner IK, Maldoveanu A, Vasiliou P, Shek P, Shepard RJ. Effects of three different types of exercise on blood leucocyte count during and following exercise. *Rev Paul Med* 2003;12(1):9-14
210. Shepard RJ, Shek PN. Impact of physical activity and sport on the immune system. *Rev Environ Health* 1996;11(3):133-47
211. Northoff H, Enkel S, Weinstock C. Exercise, injury and immune function. *Exerc Immunol Rev* 1995;1:1-25
212. Garrey WE, Bryan WR. Variation in the white blood cell content. *Physiol Rev* 1935;15(4):597-638
213. McCarthy DA, Grant M, Marbut M, Watling M, Wade AJ, MacDonald I, Nicholson S, Melsom RD, Perry JD. Brief exercise induce an immediate and a delayed leucocytosis. *Br J Sp Med* 1991;25(4):191-5
214. Keast D, Morton AR. Long-term exercise and immune functions. In: *Exercise and disease* RR Watson and M Eisinger, eds Boca Raton, FL: CRC Press 1992; pp 89-120

215. MacKinnon LT, Tomasi TB. Immunology of exercise. In: Sports Medicine; Fitness Training Injuries O Apenzeller, eds Baltimore: Urban and Schwarzenberg 1988; pp 273-89
216. MacDougall JD, Tuxen D, sale DG, Moroz JR, Sutton JR. Arterial blood pressure response to heavy resistance exercise. *J Appl Physiol* 1985;58(3):785-90
217. Sale DG, Moroz DE, McKelvie RS, MacDougall JD, MacCarney N. Effect on training on the blood pressure response to weight lifting. *Can J Appl Physiol* 1994;19(1):60-74
218. Kraemer WJ, Marchitelli L, Gordon SE, Harman E, Dziados JE, Mello T, Frykman P, McCurry D, Fleck SJ. Hormonal and growth factor responses to heavy resistance exercise protocols. *J Appl Physiol* 1990;69(4):1442-50
219. Nieman DC, Henson DA, Sampson CS, Hering JL, Suttle J, Conley M, Stone MH, Butterworth DE, Davis JM. The acute immune response to exhaustive resistance exercise. *Int J Sports Med* 1995;16(5):322-28
220. Shmid-Shoenbein G, Ross J Jr. Structure-function relation in the peripheral circulation. In: Best and Taylors Physiological Basis of Medical Practice (12th ed). J Ross Jr, ed Baltimore: Williams and Wilkins 1990; pp118-37
221. Janeway CA Jr, Travers P. Immunobiology: the immune system in health and disease. New York: Garland Publishing Inc 1996; pp 234-41
222. Simon HB. Exercise, infection and immunity. In: Exercise in the practice of medicine (2nd ed). GF Fletcher, ed, Mount Kisco, NY: Futura Publishing Co., Inc 1988; pp 337-59
223. Verde TJ. Short-term exercise and immune fuction. In: Exercise and Disease. RR Watson and M Eisinger, eds,Boca Raton FL:CRC Press 1992; pp 71-88
224. Tvede N, Pederson BK, Hansen FR, Bendix T, Christensen LD, Galbo H, Halkjaer-Kristensen. Effect of physical exercise on blood mononuclear cell subpopulation and in vitro proliferative response. *Scand J Immunol* 1989;29(3):383-9
225. Cannon JG, Fielding RA, Fiartrone MA, Orencole SF, Dinarello CA, Evans WJ. Increased interleukin 1-beta in human skeletal muscle after exercise. *Am J Physiol* 1989;257(2Pt2):R451-5

226. Robertson AJ, Ramesar CRB, Potts RC, Gibbs JH, Browning MCK, Brown RA, Hayes PC, Swanson B. The effect of strenuous physical exercise on circulating blood lymphocytes and serum cortisol levels. *J Clin Lab Immunol* 1981;5(1):53-7
227. Asselin P, Benquet C, Krzystyniak K, Brousseau P, Savard R, Fournier M. In vivo indomethacin reverse exercise-induced immunosuppression in rats. *Int J Immunopharmacol* 1996;18(8-9):491-7
228. Bagdy GJ, Grouch LD, Shepherd RE. Exercise and cytokines: spontaneous and elite responses. In: *Exercise and Immune Function*. L Hoffman-Goetz, ed., Boca Raton, FL:CRC Press 1996; pp 55-7
229. Evans WJ, Cannon JG. The metabolic effects of exercise-induced muscle damage. In: *Exercise Sport Science Review*. JO Holloszy, ed., Baltimore: Williams and Wilkins 1991; pp 99-125
230. Fielding RA, Manfredi TJ, Ding W, Fiatarone MA, Evans WJ, Gannon JG. Acute phase response in exercise: III. Neutrophil and IL-1 β accumulation in skeletal muscle. *Am J Physiol* 1993;265(1Pt2):R166-72
231. Cormak DH. Blood cells. In: *Hans Hystology* (9th ed.) Saint Louis: JB Lippincott Company 1987; pp 188-213
232. Rowbottom DG, Green KJ. Acute exercise effects on the immune system. *Med Sci Sports exerc* 2000;32(7):S396-405
233. Smith LL. Overtraining, excessive exercise and altered immunity. *Sports Med (Auckland N.Z.)* 2003;33(5):347-64
234. Hansen JB, Wilsgard L, Osterud B. Biphasic changes in leucocytes induced by strenuous exercise. *Eur J Appl Physiol* 1991;62(3):157-61
235. Shils ME. Magnesium. In: Shils ME, Olson JA, Shike M, eds. *Modern nutrition in health and disease*. 8th ed. Philadelphia: Lea&Febifer, 1993; pp 164-84
236. Ebel H, Gunter T. Magnesium metabolism; a review. *J Clin Chem Biochem* 1980;18(5):257-70
237. Aikawa JW. *Magnesium: its biological significance*. Boca Raton FL:CRC Press 1981; pp 21-38
238. Durlach J. *Magnesium in clinical practice*. London: John Libbey Company 1988; pp 779-118

239. Liu L, Borowski G, Rose LI. Hypomagnesemia in a tennis player. *Phys Sports Med* 1983;11:79-80
240. Fogelholm M, Laasko J, Lehno J, Ruokonen I. Dietary intake and indicators of magnesium and zink status in male athletes. *Nutr Res* 1991;11:1111-8
241. Deuster PA, Dolev E, Kyle SB, Anderson RA, Schoonmaker EB. Magnesium homeostasis during high-intensity anaerobic exercise. *J Appl Physiol* 1987;62(2):545-50
242. Bohl CH, Volpe SL. Magnesium and exercise. *Grut Rev Food Sci Nutr* 2002;42(6):533-63
243. Stending-Liendeberg G, Shapiro Y, Tepperberg M, Moram D. Not only strenuous but also sustained moderate physical effort causes magnesium deficiency. *Trace Elem Electroly* 1999;16(2):156-61
244. Meludu SC, Nuschimuta M, Yoshitake Y, Toyooka F, Kodama N, Kim CS, Maekawa Y, Fukuoka H. Magnesium homeostasis before and after high intensity (anaerobic) exercise. In: Rayssinguier Y, Mazur A, Durlach J, eds. *Advance in Magnesium Research: Nutrition and Health*. London: John Libbey Company 2001; pp 443-6
245. Nielsen FH, Lukaski HC. Update on the relationship between magnesium and exercise. *Magnesium Res* 2006;19(3):180-9
246. Buchaman AL, Keen C, Commisso K, Killip D, Ou CN, Rognerud CL, Dennis K, Dunn JK. The effect of a marathon run on plasma and urine mineral and metal concentration. *J Am Coll Nutr* 1998;17(2):124-7
247. Kawabe N, Suziki M, Machida K, Shiota M. Magnesium metabolism after full marathon race. *Jap J Phys Fitness Sport Med* 1998;47:221-30
248. Lijnen P, Hespel P, Fagard R, Lysens R, Vanden E, Amery A. Erythrocyte, plasma and urinary magnesium in men before and after marathon. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1988;58(3):252-6
249. Mooren FC, Golf SW, Lechtermann A, Volker K. Alternations of ionized Mg²⁺ in human blood exercise. *Life Sci* 2005;77(11):1211-25
250. Madsen K, Pedersen PK, Djurhuus MS, Klitgaard NA. Effects of detraining on endurance capacity and metabolic changes during exhaustive exercise. *J Appl Physiol* 1993;75(4):1444-51

251. Cordova A, Escanero JF, Gimenez M. Magnesium distribution in rats after maximal exercise in air and under hypoxic conditions. *Magnes Res* 1992;5(1):23-7
252. Consolazio C. Excretion of sodium, potassium and iron in human sweat and the relation of each to balance requirements. *J Nutr* 1963;79:407-15
253. Costill DL. Sweating: its composition and effect on body fluids. *Ann NY Acad Sci* 1977;301:160-70
254. Beller GA, Maher JT, Hartley LH, Bass DE, Wacker WE. Changes in serum and sweat magnesium levels during work in heat. *Aviat Space Environ Med* 1975;46(5):709-12
255. Shirreffs SM, Maughan RJ. Whole blood sweat collection in humans: an improved method with preliminary data on electrolyte content. *J Appl Physiol* 1997;82(1):336-41
256. Monteiro CO, Santa Clara H, Raposo MF, Concalves A, Limao F, Laires MJ, Rayssiguier Y, Mazur A, Coudray C, Gueux E, Fellet Coudray C, Bicho M. Effect of exercise intensity and training on magnesium status. *Magnes Res* 2004;17(4):231-233
257. Maron BJ. Sudden death in young athletes. *N Engl J Med* 2003;349(11):1064-75
258. Maron BJ, Zipes DP. 36th Bethesda Conference: eligibility recommendations for competitive athletes with cardiovascular abnormalities. *J Am Coll Cardiol* 2005;45(8):1312-75
259. Maron BJ, Thompson PD, Puffer JC, McCrew CA, Strong WB, Douglas PS, Clark LT, Mitten MJ, Atkins DL, Driscoll DJ, Epstein AL. American Heart Association statement for health professionals: cardiovascular preparticipation screening of competitive athletes. *Circulation* 1996;94(4):850-56
260. Maron BJ, Pelliccia A, Spirito P. Cardiac disease in young trained athletes: insight into methods for distinguishing athletes from structural heart disease, with particular emphasis on hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 1995;91(5):1596-601
261. Pelliccia A, Calasso F, Di Paolo F, Maron BJ. Physiological left ventricular cavity dilatation in elite athletes. *Ann Intern Med* 1999;130(1):23-31
262. Maron BJ, Pelliccia A. The heart of trained athletes: cardiac remodeling and the risks of sports, including sudden death. *Circulation* 2006;114(15):1633-44

263. Overgaard K, Lindstrom T, Ingemann-Hansen T. Membrane leakage and increased content of Na-K pumps and Ca in human muscle after 100 km run. *J Appl Physiol* 2002;92(5):1891-8
264. Starnes JW, Bowles DK. Role exercise in the cause and prevention of cardiac dysfunction. *Exerc Sport Sci Rev* 1995;23:349-74
265. Dawson E, George K, Shave R, Whyte G, Ball D. Does the human heart fatigue subsequent to prolonged exercise? *Sports Med* 2003;33(6):365-80
266. Whyte GP. Clinical significance of cardiac damage and changes in function after exercise. *Med&Exercise* 2008;40(8):1416-23
267. Bonetti A, Tirelli A, Albertini R, Monica M, Tredici G. Serum cardiac troponin T after repeated endurance exercise events. *Intern J Sport Med* 1995;17(4):259-62
268. Goodman JM, McLaughlin PR, Liu PP. Left ventricular performance during prolonged exercise: absence of systolic dysfunction. *Clin Sci (Lond)* 2001;100(5):529-37
269. Basche RJ, Schwartz JS. Effect of perfusion pressure distal to a coronary stenosis on transmural myocardial blood flow. *Circulation* 1982;65(5):928-35
270. Bolli R, Patel BS, Hartley CJ, Thornby JI, Jeroud MO, Roberts R. Nonuniform transmural recovery of contractile function in stunned myocardium. *Am J Physiol* 1989;257(2Pt2):H375-85
271. Braunwald E, Kloner RA. The stunned myocardium: prolonged postischemic ventricular dysfunction. *Circulation* 1982;66(6):1146-9
272. Douglas PS, O Toole ML, Hiller WDB, Reichek N. Left ventricular structure and function by echocardiography in ultraendurance athletes. *Am J Cardiol* 1986;58(9):805-9
273. Hauer K, Niebauer J, Weiss C, Marburger C, Hambrecht R, Schlierf G, Schuler G, Zimmermann R, Kubler W. Myocardial ischemia during physical exercise in patients with stable coronary artery disease: predictability and prevention. *Int J Cardiol* 2000;75(2-3):179-86
274. Bolli R, Marban E. Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev* 2009;79(2):609-34
275. Hearse DJ. Myocardial ischemia: can we agree on definition for the 21st century? *Cardiovasc Res* 1994;28(12):1737-44

276. Ferrari R. Pathophysiological vs biochemical ischemia: a key to transition from reversible to irreversible damage. *Eur Heart J* 2001;22(10):803-4
277. Rowe WJ. Extraordinary unremitting endurance exercise and permanent injury to normal heart. *Lancet* 1992;340(8821):712-4
278. Rowe WJ. Endurance exercise and injury to the heart. *Sports Med* 1993;16(2):73-9
279. Gert SD, Uretsky G, Wajnberg RS, Navot N, Gotsman MS. Endothelial cell damage and thrombus formation after arterial constriction: relevance to the role of coronary artery spasm in the pathogenesis of myocardial infarction. *Circulation* 1981;63(3):476-86
280. Chilian WM, Harrison DG, Haws CW, Snyder WD, Marcus ML. Adrenergic coronary tone during submaximal exercise in the dog is produced by circulating catecholamines: evidence for adrenergic denervation supersensitivity in the myocardium but not in coronary vessels. *Circ Res* 1986;58(1):68-82
281. Osbakken M, Locko R. Scintigraphy determination of ventricular function and coronary perfusion in long distance runners. *Am Heart J* 1984;108(3):595-606
282. De Zwaan C, Daemen MJAP, Hermens WT. Mechanisms of cell death in acute myocardial infarction: pathophysiological implications for treatment. *Netherlands Heart J* 2001;9(1):30-44
283. Mair J. Glycogen phosphorylase isoenzyme BB to diagnose ischemic myocardial damage. *Clin Chim Acta* 1998;272(1):79-86
284. Katus HG, Remppis A, Scheffold T. Intracellular compartmentation of cardiac troponin T and its release kinetics in patients with reperfused and nonreperfused myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1991;67(16):1360-7
285. Hofmann U, Rabitzsch G, Loster K, Handschack W, Noll F, Krause EG. Immunoenzymometric assay for the heart specific glycogen phosphorylase BB in human serum using monoclonal antibodies. *Biomed Biochim Acta* 1989;48(2-3):S132-6
286. Lacnak B, Stejskal D, Jedelsky L, Karpisek M, Sprongl L. Utilisation of glycogen phosphorylase BB in the diagnosis of acute coronary syndromes in the event of chest pain. *Vnitr Lek* 2007;53(11):1164-9

287. Stejskal D, Lacnak B, Jedalsky L. Use of glycogen phosphorylase BB measurement with POCT in the diagnosis of acute coronary syndromes. A comparison with the ELISA method. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2007;151(2):247-9
288. Krause EG, Rabitzsch G, Noll F, Mair J, Puchendorf B. Glycogen phosphorylase isoenzyme BB in diagnosis of myocardial ischemic injury and infarction. *Mol Cell Biochem* 1996;160-161:289-95
289. Dork P, Post F, Schnzel H, Schweigert R, Shollmayer C, Steinbach K, Dati F, Noll F, Lackner KJ. Glycogen phosphorylase BB in acute coronary syndromes. *Clin Chem Lab Med* 2005;43(12):1351-8
290. Neumayr G, Pfster R, Mitterbauer G, Eibl G, Hoertnagl H. Effect of competitive marathon cycling on plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide and cardiac troponin T in healthy recreational cyclists. *Am J Cardiol* 2005;5(1):732-5
291. Lippi G, Schena F, Montagna M, Salvagno GL, Guidi GC. Influence of acute physical exercise on emerging muscular biomarkers. *Clin Chem Lab Med* 2008;46(9):1313-8
292. Williams K, George K, Hulton A, Godfrey R, Lahart I, Wilson MG, Charlesworth S, Warburton D, Gaze D, Whyte G. A unique case series of novel biomarkers of cardiac damage in cyclists completing the 4800 km race across America (RAAM). *Curr Med Chem* 2011;18(23):3446-51
293. Zhang JJ, Chen JK, Zu M, Li PF, Chen MQ, Qui L, Yong GJ. Effects of cross/country running during empty stomach on the serum levels of glucose and free acid, glycogen phosphorylase isoenzyme BB and heart-type fatty acid binding protein. *J Med Postgraduate* 2010;3(1):135-9
294. Homans DC, Laxon DD, Sublett E, Lindstrom P, Bache RJ. Cumulative deterioration of myocardial function after repeated episodes of exercise-induced ischemia. *Am J Physiol* 1989;256(5Pt2):H462-71
295. Homans DC, Sublett E, Dai XZ, Bache RJ. Persistence of regional left ventricular dysfunction after exercise-induced myocardial ischemia. *J Clin Invest* 1986;77(1):66-73

296. Amrani M, Gray CG, Yacoub MH. Heat Stress Proteins: A possible route to myocardial protection. In: Heat Shock Protein in Myocardial Protection, eds, Landes 2000, pp 22-8
297. Currie RW, Karmzyn M, Kloe M. Heat-shock response is associated with enhanced post-ischemic ventricular recovery. *Circ Res* 1988;63(3):543-9
298. Kabakov AE, Gabai VL. Heat shock proteins and cytoprotection: ATP-deprived mammalian cells. In: Springer-Verlag, Heidelberg 1997; pp85-119
299. Samali A, Cotter TG. Heat shock proteins increase resistance to apoptosis. *Exp Cell Res* 1996;223(1):163-70
300. Kardys I, Rifai N, Meilhac O, Michel JB, Martin-Ventura JL, Buring JE, Libby P, Ridker PM. Plasma concentration of heat shock protein 27 and risk of cardiovascular disease: a prospective, nested case control study. *Clin Chem* 2008;54(1):139-46
301. Kato K, Shinohara H, Goto S. Copurification of small heat shock protein with $\alpha\beta$ -crystallin from human skeletal muscle. *J Biol Chem* 1992;267(11):7718-25
302. Arrigo AP, Laundry J. Expression and function of the low molecular weight heat shock proteins. Cold Spring Harbour Laboratory Press NY 1994; pp335-73
303. Brar BK, Stephanou A, Wagstaff MJ, Marber MS, Engelmann G. Heat shock proteins derived with a virus vector can protect cardiac cells against apoptosis as well as against thermal or hypoxic stress. *J Mol Cell Cardiol* 1999;31(1):135-46
304. Hollander JM, Martin IL, Belke DD, Scott BT, Swanson E, Krishnamoorthy V. Overexpression of wild-type heat shock protein 27 and a nonphosphorylatable heat shock protein 27 mutant protects against ischemia/reperfusion injury in transgenic mouse model. *Circulation* 2004;110(23):3544-52
305. Vander Heide RD. Increased expression of Hsp27 protects canine myocytes from simulated ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;282(3):H935-41
306. Lu XY, Chen L, Cai YL, Yang HT. Overexpression of heat shock protein 27 protects against ischemia/reperfusion-induced cardiac dysfunction via stabilization of troponin I and T. *Cardiovasc Res* 2008;79(3):500-8
307. Liu L, Zhang XJ, Jiang SR, Ding ZN, Ding GX, Huang J, Cheng YL. Heat shock protein 27 regulates oxidative stress-induced apoptosis in cardiomyocytes: mechanisms

- via reactive oxygen species generation and Akt activation. *Chin Med J* 2007;120(24):2271-7
308. Rouse J, Cohen P, Trigon S. A novel kinase cascade by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* 1994;78(6):1027-37
309. Santell L, Barfeld NS, Levin EG. Identification of a protein transiently phosphorylated by activators of endothelial cell function as the heat shock protein HSP27. A possible role for protein kinase C. *Biochem J* 1992;284(Pt3):705-10
310. Lavoie JN, Lambert H, Hickey E. Modulation of cellular thermoresistance and actin filament stability accompanies phosphorylation-induced changes in the oligomeric structure of heat shock protein 27. *Mol Cell Biol* 1995;15(1):505-16
311. Kato K, Ito H, Iwamoto I, Iida K, Inaguma Y. Protein kinase inhibitors can suppress stress-induced dissociation of Hsp27. *Cell Stress Chaperones* 2001;6(1):16-20
312. Doppler H, Storz P, Li J, Comb MJ, Toker A. A phosphorylation state-specific antibody recognizes Hsp27, a novel substrate of protein kinase D. *J Biol Chem* 2005;280(15):15013-9
313. Park HK, Park EC, Base SW, Kim SW, Yoo HS. Expression of heat shock protein 27 in human atherosclerotic plaques and increased plasma level of heat shock protein 27 in patients with acute coronary syndrome. *Circulation* 2006;114(9):886-93
314. Kinag JG, Tsokos GC. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology biochemistry and physiology. *Pharmacological Therapy* 1998;80(2):183-201
315. Knowlton AA. The role of heat shock proteins in the heart. *J Mol and Cell Cardiol* 1995;27(1):121-31
316. Kregel KC. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol* 2002;92(5):2177-86
317. Maestri R, Dillman WH. Heat shock protein and protection against myocardial ischemia. *J Mol and Cell Cardiol* 1995;27(1):45-52
318. Powers SK, Locke M, Demirel HA. Exercise, heat shock proteins, and myocardial protection from I-R injury. *Med and Sci in Sports and Exerc* 2001;33(3):386-92

319. Morton JP, Kayani AC, McArdle A, Drust B. The exercise-induced stress response of skeletal muscle, with specific emphasis on humans. *Sports Med* 2009;39(8):643-62
320. Morton JP, MacLaren DP, Cable NT, Campbell IT, Evans AC, McArdle A, Drust B. Trained men display increased basal heat shock protein content of skeletal muscle. *Med Sci Sports Exerc* 2008;40(7):1255-62
321. Xu Q. Role of heat shock proteins in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22(10):1547-59
322. Pavlik G, Kemeny Z, Petrekanits M, Hovath P, Sido Z. Echocardiographic data in Hungarian top-levels water polo players. *Med Sci Exerc* 2005;37(2):323-8
323. Uchechukwu D, Ugwe AC. Determination of systolic blood pressure recovery time after exercise in apparently healthy, normotensive, nonathletic adults and the effects of age, gender and exercise intensity. *Int J Exerc Sci* 2009;2(2):115-30
324. Clausen JP. Effect of physical training of cardiovascular adjustments to exercise in man. *Physiol Rev* 1977;57(4):779-815
325. Snell PG, Martin WH, Buckley JC, Blomquist CG. Maximal vascular leg conductance in trained and untrained men. *J Appl Physiol* 1987;62(2):606-10
326. Tanaka H, Bassett DR, Turner MJ. Exaggerated blood pressure response to maximal exercise in endurance-trained individuals. *Am J Hypertens* 1996;9(11):1099-103
327. Rowell LB. Blood pressure regulation during exercise. *Ann Med* 1991;23(3):329-33
328. Geiger H, Wanner C. Magnesium in disease. *Clin Kidney J* 2012;5(1):125-38
329. Altura BM, Altura BT. New perspectives on the role of magnesium in the pathophysiology of the cardiovascular system. I. Clinical aspects. *Magnesium* 1985;4(5-6):226-44
330. Ma J, Folsam AR, Melnic SL. Associations of serum and dietary magnesium with cardiovascular disease, hypertension, diabetes, insulin and carotid arterial wall thickness: the ARIC study. *Atherosclerosis Risk in Communities Study. J Clin Epidemiol* 1995;48(7):927-40

331. Picado MJ, de la Sierra A, Agillera MT. Increased activity of the Mg/Na exchanger in red blood cells from essential hypertensive patients. *Hypertension* 1994;23(6Pt2):987-91
332. Touyz RM, Milne FJ. Alterations in intracellular cations and cell membrane ATPase activity in patients with malignant hypertension. *J Hypertens* 1995;13(8):867-74
333. Touyz RM, Schiffin EL. Activation of Na-H exchanger modulates angiotensin II-stimulated Na-dependent Mg transport in vascular smooth muscle cells in genetic hypertension. *Hypertens* 1999;34(3):442-9
334. Antman EM. Magnesium in acute myocardial infarction: overview of available evidence. *Am Heart J* 1996;132(2Pt2 Su):487-95

BIOGRAFIJA AUTORA

Slavić Vjeroslava rođena je 1972. godine u Podgorici gdje je završila Osnovnu školu i Gimnaziju. Školske 1991/92 godine upisuje Medicinski fakultet-Univerziteta u Nišu gdje je diplomirala 1998. godine sa prosječno ocjenom 9.37. Poslijediplomske studije upisuje školske 1998/99 na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Nišu-oblast klinička imunologija, i položila je sve predviđene ispite sa prosječnom ocjenom 10.

Specijalizirala je imunologiju na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Nišu, i položila specijalistički ispit 2005. godine ocjenom odličan i stekla zvanje specijaliste imunologije.

Iste 2005. godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Nišu je odbranila magistarsku tezu pod nazivom „*Značaj hemokina inteleukina 8 i monocitnog hemoatraktantnog proteina 1 u patogenezi reumatoidnog artritisa*“ pod mentorstvom Prof. dr Borislava Kamenova i stekla zvanje magistra medicinskih nauka-oblast klinička imunologija.

Stalno je zaposlena u Institutu „Dr Simo Milošević“ u Igalu od 1998. godine, a od 2006. godine je raspoređena na mjesto Načelnika laboratorijske dijagnostike.

Školske 2005/2006 do 2009/2010. godine bila je angažovana kao predavač u Visokoj školi sestrinstva Univerziteta Lovisenberg “Kraljica Jelena” u Igalu.

Član je ljekarske komore Crne Gore.

Autor je više radova objavljenih u indeksiranim časopisima. Učestvovala na brojnim domaćim i međunarodnim kongresima, izdvajamo svjetske kongrese sportske medicine u Portoriku 2010. i Rimu 2012. godine.

IZJAVE AUTORA



Прилог 1.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, по ч насловом

ГЛИКОГЕН ФОСФОРНАЗА ТИП 66 И ХИ ШОК ПРОБЕН ВХ: ИНДИКАТОРИ
ИНОКАРДНОГ СТРЕСА КОЛ ИНТЕРЛОЦИСТА

- резултат самосталног истраживачког рада.
- да представљена дисертација, ни у целини, ни у деловима, није била целокупно или делимично било које друге докторске дисертације, према студентским програмима других високообразовних установа,
- да су резултати ховства изведени и
- да свако државно или ауторско право, патент и/или друга правна средства везана за овај рад припадају само аутору.

У Нишу, 2013

Аутор дисертације: МР БЈЕРСАВА СЛАВИЋ

Полне докторске
Славка Бјерскава



Прилог 2.

ИЗЈАВА О ИСТОБЕТНОСТИ ПИТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Име и презиме аутора: МР ВЈЕРОСЛАВА СЛАВИЋ

Студијски програм: ХИМИЈА ИМУНОЛОГИЈА

Наслов рада: ГЛИКОСИДНА ЗАШТИТА И ИОНСКИ ПРОТЕИНА БИ-
ИНДИКАТОРИ ИМОБИЛИЗАЦИЈЕ ЦЕЛУЛОЗНОГ ПИРЕКСИДНОГ МАТЕРИЈАЛА

Ментор: ПРОФ. ДР БОРИСЛАВ КАНЕЛОВ

Изјављујем да је штампана верзија моје докторске дисертације истоветна електронској верзији, коју сам представљао за уношење у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одbrane рада, и то у каталогу Библиотеке Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, 2013

Аутор дисертације: МР ВЈЕРОСЛАВА СЛАВИЋ

Полис докторанта:

Славак Вјерослав



Прилог 3.

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску Библиотеку „Никола Тесла“ д.д. у Дигиталном репозиторијум Универзитета у Нишу, увести моју докторску дисертацију, под насловом:

ГЛИКОГЕН ФOSFOPIHЛАЗА I ИР OЉ П ИТ ШOЉ ПРОТЕИН И I -
ИИДИКАТОРИ ИИОКРАИНО СТРЕСА ИСА ВИСЕРОСАИСТА.

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предаћу сам у електронском формату, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, увесту у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који подлогују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне траједице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство – некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Можемо да издучимо само једну од ових овлашћених лиценци; кратак назив лиценце је у наредном појасу).

У Нишу, 2015

Аутор дисертације: ИР ВЈЕРОСАИВА САВИИ

Потпис докторице:
Ираба Вјеросаива