

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Danica M. Michaličkova

**UTICAJ SUPLEMENTACIJE SOJEM
LACTOBACILLUS HELVETICUS L10 NA
MARKERE IMUNOLOŠKOG I
OKSIDATIVNOG STATUSA VRHUNSKIH
SPORTISTA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2017

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Danica M. Michaličkova

**THE EFFECT OF LACTOBACILLUS
HELVETICUS L10 SUPPLEMENTATION ON
MARKERES OF IMMUNOLOGICAL AND
OXIDATIVE STATUS IN ELITE ATHLETES**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2017

MENTOR:

Dr sc. Brižita Đorđević, redovni profesor
Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

Dr sc. Rajna Minić, viši naučni saradnik
Odsek za naučno-istraživački rad, Institut za virusologiju, vakcine i serume, Torlak

Dr sc. Jelena Kotur-Stevuljević, vanredni profesor
Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr sc. Nataša Golić, naučni savetnik
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

Dr sc. Bojana Vidović, docent
Katedra za bromatologiju, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu

U Beogradu, _____

Na početku želim da izrazim zahvalnost svima koji su mi, svako na svoj način, pomogli da započnem i završim ovu doktorsku disertaciju.

Najpre, veliku zahvalnost dugujem svojoj mentorki prof. dr Brižiti Đorđević na velikoj pomoći tokom svih faza izrade doktorske disertacije, na korisnim savetima, strpljenju i prenetim znanjima. Posebno se zahvaljujem na razumevanju i prijateljskom pristupu, kao i moralnoj i emotivnoj podršci.

Zatim, zahvaljujem se dr sc. Rajni Minić na velikom trudu uloženom tokom izrade ove disertacije, počevši od osmišljavanja teme istraživanja, preko eksperimentalnog rada, do tumačenja rezultata i pisanja manuskripta. Zahvaljujem se na nesebičnosti sa kojom je svoje veliko znanje i iskustvo delila sa mnom.

Zahvalnost dugujem i dr sc. Jeleni Kotur-Stevuljević na zalaganju, interesovanju, kreativnim idejama i znanjima koje mi je prenosila tokom izrade ove disertacije.

Takođe, zahvaljujem se dr sc. Nataši Golić na ukazanom poverenju i stručnim savetima koje mi je pružila tokom rada na disertaciji.

Zahvaljujem se i dr sc. Bojani Vidović za profesionalnu i ličnu podršku tokom izrade disertacije i stručne savete pri rešavanju problema.

Veliku zahvalnost izražavam dr Nenadu Dikiću na ogromnoj energiji i istrajnosti bez kojih ova studija ne bi bila moguća. Dugujem zahvalnost za poverenje koje mi je ukazano i izvanrednu mogućnost da saradujem sa najboljim sportistima Republike Srbije.

Zahvaljujem se dr Mariji Anđelković i dr Mariji Kostić-Vučićević na entuzijazmu tokom regrutovanja sportista, sakupljanja uzoraka, ali i velikoj moralnoj podršci i korisnim savetima i smernicama u radu sa vrhunskim sportistima.

Zahvaljujem se zaposlenima ordinacije za sportsku medicinu *Vita maxima* na predanosti i profesionalnosti tokom sportsko-medicinskih pregleda i sakupljanja bioloških uzoraka.

Zahvaljujem se svim sportistima koji su učestvovali u ovom istraživanju.

Zahvaljujem se dr sc. Ivani Baralić i dr sc. Neveni Ivanović na ogromnoj moralnoj podršci tokom teških trenutaka izrade ove disertacije.

Zahvaljujem se zaposlenima na Katedrama za bromatologiju i medicinsku biohemiju.

Na kraju, ali nikako kao poslednje, zahvaljujem se svojoj porodici i prijateljima na velikom razumevanju, ogromnoj podršci i beskrajnom strpljenju. Posebno se zahvaljujem svom mužu Martinu što me je čekao tako dugo, što je imao vere i strpljenja i nije odustao od nas.

Uticaj suplementacije sojem *Lactobacillus helveticus* L10 na markere imunološkog i oksidativnog statusa vrhunskih sportista

Rezime

Umerena fizička aktivnost (FA) ima pozitivne zdravstvene efekte, u vidu prevencije i smanjenja rizika od hroničnih nezaraznih bolesti, kao što su gojaznost, dijabetes, kardiovaskularna oboljenja. Intenzivno treniranje pak uzrokuje povećano stvaranje slobodnih radikala, što usled narušavanja strukture i funkcije biomolekula, vodi ka oštećenju mišića i smanjenju sportskih performansi. Pored toga, intenzivna FA izaziva prolazne, ali i dugoročne posledice po različite komponente imunskog sistema, što dalje ima negativne implikacije u domenu infekcija gornjeg respiratornog trakta, posebno tokom zimskog perioda. Povećana učestalost respiratornih infekcija se pre svega povezuje sa oštećenjem mukoznog imuniteta, tj. smanjenjem apsolutne koncentracije i brzine sekrecije salivarnih IgA antitela. Aktuelne kliničke studije sprovedene na vrhunskim sportistima ukazuju na sposobnost probiotskih sojeva da moduliraju imunski sistem, kao i da smanje učestalost, dužinu i težinu simptoma respiratornih infekcija.

Cilj ove disertacije bio je da se ispita uticaj suplementacije sojem *Lactobacillus helveticus* L10 na pojavu, dužinu trajanja i težinu simptoma infekcija gornjeg respiratornog trakta tokom zimskog perioda u populaciji vrhunskih sportista. Pored toga, cilj studije je bio i procena efekata suplementacije na odabrane markere imunskog i oksidativnog statusa, kao i sportske performanse, telesnu kompoziciju, osnovne biohemijske parametre i psihološke parametre.

Ispitivanje je sprovedeno kao randomizovana, dvostruko slepa, placebo-kontrolisana klinička studija, u skladu sa etičkim standardima Helsinške deklaracije i pravilima Etičkog komiteta Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. U studiji je učestvovalo 39 vrhunskih sportista. Eksperimentalna grupa je oralno uzimala kapsule *L. helveticus* Lafti® L10 u dnevnoj dozi od $2 \cdot 10^{10}$ CFU (*Collony Forming Units*), proizvođača *Lallemand Health Solutions*, Montreal, Kanada. Kontrolna grupa je primala placebo kapsule, identične probiotskim kapsulama po organoleptičkim osobinama.

Suplementacija sojem *L. helveticus* L10 nije uticala na učestalost i težinu respiratornih simptoma. Međutim, doprinela je smanjenju dužine trajanja respiratornih infekcija, što se najverovatnije može pripisati sposobnosti održanja nivoa mukoznog i humoralnog imuniteta

tokom zimske sezone. Suplementacija sojem *L. helveticus* L10 je sprečila pad ukupnih IgA antitela, kao i specifičnih IgG antitela prema *Enterococcus faecalis* i specifičnih IgA antitela prema određenim sojevima laktobacilusa u serumu. Ojačanje humoralnog imuniteta je najverovatnije povezano sa povećanjem odnosa CD4+/CD8+ ćelija. Nije zabeležen uticaj suplementacije na parametre celularnog imuniteta: citokine IFN- γ , IL-10, IL-4, TGF- β 1, kao i na udeo određenih limfocitnih i leukocitnih populacija. Suplementacija sojem *L. helveticus* L10 nije uticala na markere lipidnog statusa i oksidativnog stresa. Ipak, zabeležen je visok nivo markera oksidativnog stresa (AOPP, MDA, TOS, PAB) i nizak nivo parametara antioksidativnih zaštitnih mehanizama (SOD i TAS) u odnosu na referentne vrednosti. Ovi nalazi ukazuju na to da FA dovodi do povećanja oksidativnog stresa i ispoljava kumulativne efekte na oksidaciju lipida i proteina, bar u ovoj specifičnoj grupi vrhunskih sportista. Pored toga, u probiotskoj grupi je uočeno povećanje subjektivnog osećaja snage. Nije zabeležena promena VO₂max, kao ni telesne kompozicije ni u jednoj grupi.

Suplementacija sojem *L. helveticus* L10 doprinosi skraćenju dužine trajanja respiratornih infekcija, zahvaljujući sposobnosti održavanja nivoa mukoznog i humoralnog imuniteta. Ipak, suplementacija sojem *L. helveticus* L10 ne utiče na sportske performanse, kao ni na parametre lipidnog i oksidativnog statusa. Periodi intenzivnog treniranja ugrožavaju mehanizme antioksidativne zaštite i rezultuju povećanjem oksidativnog stresa u ispitivanoj grupi vrhunskih sportista.

Ključne reči: vrhunski sportisti, mukozni i humoralni imunitet, respiratorne infekcije, oksidativni stres

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Bromatologija

UDK broj: 613.2:[615.2:616.092(043.3)]

The effect of *Lactobacillus helveticus* L10 supplementation on markers of immunological and oxidative status in elite athletes

Abstract

Moderate physical activity (PA) exerts positive health effects, such as prevention and risk reduction of chronic diseases like obesity, diabetes and cardiovascular diseases. Strenuous training causes increased production of free radicals, leading to the destruction of important biomolecules. This can result in muscle damage and impairment of athletic performance. In addition, intensive PA causes transient and long-term perturbations of immune system, resulting in increased incidence of upper respiratory tract illness (URTI), especially during winter. Higher incidence of URTI in elite athletes is primarily influenced by mucosal immunity disruption, i.e. reduction in absolute concentration and secretion rate of salivary IgA antibodies. Clinical studies conducted in elite athletes demonstrate the ability of probiotic strains to modulate the immune system and consequently reduce the incidence, duration and severity of symptoms of respiratory infections.

The aim of this study was to investigate the effects of *Lactobacillus helveticus* L10 supplementation on incidence, duration and severity of symptoms of URTI during the winter period in elite athletes. In addition, the goal of the study was the assessment of the effects of supplementation on selected markers of immune and oxidative status, as well as sports performance, body composition, basic biochemical parameters and mood.

The study was conducted as a randomized, double-blind, placebo-controlled parallel-groups design procedure, following the guidelines laid down in Declaration of Helsinki. The trial was approved by the Ethics Committee of the Faculty of Pharmacy, University of Belgrade. The study included 39 elite athletes. The experimental group received capsules *L. helveticus* L10 in a daily dose of 2×10^{10} CFU (Colony Forming Units), by manufacturer Lallemand Health Solutions, Montreal, Canada. The control group received placebo capsules, which were identical to probiotic capsules in organoleptic characteristics.

L. helveticus L10 supplementation did not affect the incidence and severity of respiratory symptoms. However, it reduced the duration of URTI, which is likely due to the maintenance of mucosal and humoral immunity. *L. helveticus* L10 supplementation prevented the fall in total IgA antibodies, as well as in specific IgG antibodies toward *Enterococcus faecalis* and specific

IgA antibodies toward certain strains of lactobacilli in serum. Preservation of humoral immunity was probably related to the increment of CD4⁺/CD8⁺ cells ratio. There was no effect of *L. helveticus* L10 supplementation on the parameters of cellular immunity, such as cytokines IFN- γ , IL-10, IL-4, TGF- β 1 and certain leukocytes and lymphocytes populations. *L. helveticus* L10 did not affect markers of lipid status. High levels of markers of oxidative stress (AOPP, MDA, TOS, PAB) and low concentrations of parameters of antioxidant mechanisms (SOD and TAS) compared to the reference values were found. These results indicated that the intensive PA led to increased oxidative stress, and exerted a cumulative effect on lipid oxidation and protein, at least in this specific group of elite athletes. In addition, a significant increase of vigor was noted in the probiotic group. There was no significant change in VO₂max and the body composition in any group.

Probiotic strain *L. helveticus* Lafti® L10 can reduce URTI in elite athletes during winter due to preservation of mucosal and humoral immunity. However, strain *L. helveticus* L10 does not affect sports performance, as well as the parameters of lipid and oxidative status. Strenuous training depletes antioxidative defense and increases oxidative stress.

Key words: elite athletes, mucosal and humoral immunity, upper respiratory tract illness, oxidative stress

Scientific field: Pharmacy

Scientific topic: Bromatology

UDK number: 613.2:[615.2:616.092(043.3)]

LISTA SKRAĆENICA KORIŠĆENIH U TEKSTU

ALA – eng. *alpha - linolenic acid* - alfa-linolenska kiselina

AMP – anti-mikrobni peptidi

APĆ – antigen prezentujuće ćelije

APRIL – eng. *A Proliferation- Inducing Ligand*

ATP – adenzon-tri-fosfat

BAFF – eng. *B-cell Activating Factor of the TNF Family*

BAP - eng. *biological antioxidant potential*

BCMA – eng. *B-cell maturation antigen*

BMK – bakterije mlečne kiseline

BSA – eng. *Bovine Serum Albumin* – albumin seruma govečeta

CAT – katalaza

CFU – eng. *Colony Forming Units*

CRP – C-reaktivni protein

DC-SING – eng. *dendritic cell (DC)-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin*

DĆ – dendritske ćelije

DHA – eng. *docosahexaenoic acid* – dokozaheksaenska kiselina

DRI – eng. *Dietary Reference Intake*, dijetarni referentni unos

EFSA – eng. *European Food Safety Agency*

ELISA – eng. *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* - enzimski imunosorbent test

ECP – eng. *eosinophil cationic protein*, eozionofilni katjonski protein

EPA – eng. *eicosapentaenoic acid* – eikozapentaenska kiselina

FA – fizička aktivnost

FCS – eng. *Fetal Calf Serum* – fetalni serum govečeta

FITC – eng. Fluorescein Isothiocyanate

GALT – eng. *Gastrointestinal Associated Lymphoid Tissue*

GI – gastrointestinalni

GIT – gastrointestinalni trakt

GMCSF – eng. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*

GPX – glutation peroksidaza

GRAS – eng. *Generally Recognise As Safe*

GR – glutation reduktaza

GSH – redukovani glutation

H₂O₂ – vodonik peroksid
GSSG – oksidovani glutation
HDL – eng. *High Density Lipoprotein* - lipoprotein velike gustine
IEĆ – intestinalne epitelne ćelije
IgA – imunogloblin A
IL-10 – interleukin 10
IL-12 – interleukin 12
IL-2 – interleukin 2
IL-35 – interleukin 35
IL-6 – interleukin 6
ILF – izolovani limfoidni folikul
INF-γ – interferon γ
KVB – kardiovaskularne bolesti
LAB – eng. *Lactic Acid Bacteria*- bakterije mlečne kiseline
LDL – eng. *Low Density Lipoprotein* - lipoprotein male gustine
LPS – lipopolisaharid
MAMPs – eng. *Microorganism-Associated Molecular Patterns*
MLN – mezenterični limfni čvor
MMK – mononezasićene masne kiseline
MRS – eng. *deMan, Rogosa and Sharpe*
NADPH – redukovani nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat
NF-κB – eng. *Nuclear Factor kappa B*
NK – eng. *Natural Killer*
NOS – eng. *Nitric Oxide Synthase*, azot monoksid sintaza
oxLDL – oksidovane LDL čestice
PAB – prooksidativno-antioksidativni balans
PBS – eng. *Phosphate Buffer Saline*
PE – eng. *phycoerythrin*
PGN – peptidoglikan
PLA2 – fosfolipaza A2
PMK – polinezasićene masne kiseline
POazna- paraoksonazna
PON1- paraokonaza 1
PRRs – eng. *Pattern Recognition Receptors*

QPS – eng. *Qualified Presumption of Safety*

RDA – eng. *Reccomended Dietary Allowances*

REM – eng. *Relative Electrophoretic Mobility*, relativna migraciona daljina

RNS – *Reactive Nitrogen Species*

ROS – *Reactive Oxigen Species*

ROM – eng. *Reactive Oxygen Metabolites*

RSS – *reactive sulfur species*

SCFA – eng. *Short Chain Fatty Acid* , kratkolančane masne kiseline

SH – sulfhidrilne grupe

SOD – superoksid dismutaza

SR – sarkoplazmatski retikulum

SZO – Svetska Zdravstvena Organizacija

TAC– totalni antioksidativni kapacitet

TAS – totalni anitoksidativni status

TBA – engl. *thiobarbituric acid*, tiobarbiturna kiselina

TBKRS – tiobarbiturna kiselina reagujuće supstance

TEAC – trolox equivalent antioxidant capacity, troloks ekvivalentni anioksidativni kapacitet

TGC – trigliceridi

TGF-β1 – engl. *Transforming growth factor beta 1*, transformišući faktor rasta beta 1

Th – eng. *T helper* – pomoćnički T limfocit

TLRs – eng. *Toll-like Receptors*

TMB - tetrametilbenzidin

TNF-α – eng. *Tumor Necrosis Factor-α* - faktor tumorske nekroze α

TOS – totalni oksidativni status

TP – ukupni proteini

Treg – regulatorne T ćelije

TSLP – engl. *Thymic stromal lymphopoiethin*

UH – ukupni holesterol

URTI – engl. *Upper Respiratory Tract Illness*, infekcija gornjih respiratonih puteva

UV/VIS – ultraviolet/vidljiva svetlost

VLDL – engl. *Very Low Density Lipoprotein*, lipoprotein male gustine

VO2max – maksimalna potrošnja kiseonika ili aerobni kapacitet

XDH – ksantin dehidrogenaza

ZMK – zasićene masne kiseline

Sadržaj

1	Uvod.....	1
1.1	Fiziološki efekti fizičke aktivnosti.....	2
1.1.1	Utjecaj FA na imunitet.....	4
1.1.2	Utjecaj fizičke aktivnosti na oksidativni status.....	21
1.2	GI mikrobiota čoveka i probiotici.....	26
1.2.1	GI mikrobiota čoveka.....	26
1.2.2	Utjecaj fizičke aktivnosti na sastav mikrobiote	29
1.2.3	Probiotici.....	30
1.2.4	Interakcije probiotskih bakterija i imunskog sistema.....	36
1.2.5	Probiotici u sportu.....	44
2	Ciljevi istraživanja	48
3	Ispitanici i metode.....	50
3.1	Eksperimentalni dizajn i ispitanici.....	51
3.2	Kardiopulmonarni test	54
3.3	Laboratorijske metode	55
3.3.1	Određivanje parametara mukoznog, humoralnog i celularnog imuniteta	56
3.3.2	Određivanje lipidnog statusa i biohemijskih parametara	65
3.3.3	Određivanje parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite.....	66
3.4	Upitnici	77
3.4.1	Procena pojave, dužine trajanja infekcija gornjeg respiratornog trakta i subjektivnog osećaja težine respiratornih simptoma	77
3.4.2	Upitnik o stanju raspoloženja.....	78
3.4.3	Merenje intenziteta treniranja	79
3.5	Statistička analiza.....	79
4	Rezultati	80
4.1	Profil sportista.....	81
4.2	Procena respiratornih i GIT simptoma.....	84
4.3	Utjecaj suplementacije sojem <i>L. helveticus</i> L10 na mukozni, humoralni i celularni imunitet	85
4.3.1	Utjecaj suplementacije sojem <i>L. helveticus</i> L10 na mukozni imunitet.....	85
4.3.2	Utjecaj soja <i>L. helveticus</i> L10 na humoralni imunitet	88
4.3.3	Utjecaj suplementacije na celularni imunitet.....	92

4.4	Uticaj suplementacije sojem <i>L. helveticus</i> L10 na parametre oksidativnog statusa, oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite.....	96
4.4.1	Uticaj suplementacije sojem <i>L. helveticus</i> L10 na parametre oksidativnog stresa i statusa u LDL frakciji	98
4.4.2	Uticaj suplementacije sojem <i>L. helveticus</i> L10 na parametre oksidativnog statusa i stresa u HDL frakciji.....	100
4.5	Biohemijski parametri i kardiovaskularni rizik	100
4.6	Uticaj soja <i>L. helveticus</i> L10 na raspoloženje (upitnik o stanju raspoloženja).....	102
4.7	Uticaj soja <i>L. helveticus</i> L10 na sportske performanse.....	104
5	Diskusija	106
5.1	Uticaj suplementacije sojem <i>L. helveticus</i> L10 na respiratorne infekcije	107
5.2	Uticaj suplementacije sojem <i>L. helveticus</i> L10 na odabrane parametre mukoznog, humoralnog i celularnog imuniteta.....	109
5.2.1	Uticaj soja <i>L. helveticus</i> na mukozni imunitet	109
5.2.2	Uticaj soja <i>L. helveticus</i> na humoralni imunitet.....	111
5.2.3	Uticaj soja <i>L. helveticus</i> na celularni imunitet	114
5.3	Uticaj suplementacije sojem <i>L. helveticus</i> L10 na lipidni status i kardiovaskularni rizik	118
5.4	Uticaj suplementacije sojem <i>L. helveticus</i> na oksidativni status i mehanizme anti-oksidativne zaštite	119
5.5	Uticaj soja <i>L. helveticus</i> na raspoloženje i sportske performanse	123
6	Zaključci	126
7	Literatura.....	129

1 Uvod

1.1 Fiziološki efekti fizičke aktivnosti

Umerena fizička aktivnost (FA) ostvaruje pozitivne fiziološke efekte, doprinoseći prevenciji i smanjenju rizika od hroničnih nezaraznih bolesti, kao što su kancer, kardiovaskularne bolesti (KVB), gojaznost itd. Hipoteza U-krive, iako zasnovana na relativno ograničenom broju laboratorijskih i epidemioloških podataka, počiva na ideji zavisnosti zdravstvenih benefita od intenziteta FA (Nieman i sar, 1990; Shepard i sar, 1995). Tako se npr. umerena FA dovodi u vezu sa smanjenim rizikom od nekih vrsta kancera (Shepard i Fletcher, 1997), a animalne studije ukazuju i na sniženje verovatnoće pojave metastaza (MacNeil i Hoffman-Goetz, 1993). Sa druge strane, intenzivna FA remeti homeostazu organizma, što pokreće kaskadu metaboličkih i imunoloških reakcija u organizmu, vodeći ka povećanoj sintezi proteina akutne faze, pojačanom oslobađanju hormona, pre svega adrenalina i kortizola, preraspodeli elektrolita usled dehidracije i ubrzanoj biosintezi mitohondrija u mišićima (Mach i Fuster-Botella, 2016). Smatra se da naporno i dugotrajno treniranje uzrokuje povećano stvaranje reaktivnih oksidativnih vrsta (eng. *Reactive oxygen species* – ROS), koje dovode do oštećenja molekula DNK, lipida, proteina, što preko uticaja na ekspresiju gena vodi ka apoptozi ćelija (Teixeira i sar, 2009). Na taj način nastaje stanje slično subkliničkoj sepsi, u kojoj destrukcija važnih biomolekula u organizmu dovodi do prekomerne inflamatorne reakcije (Shek i Shepard, 1998).

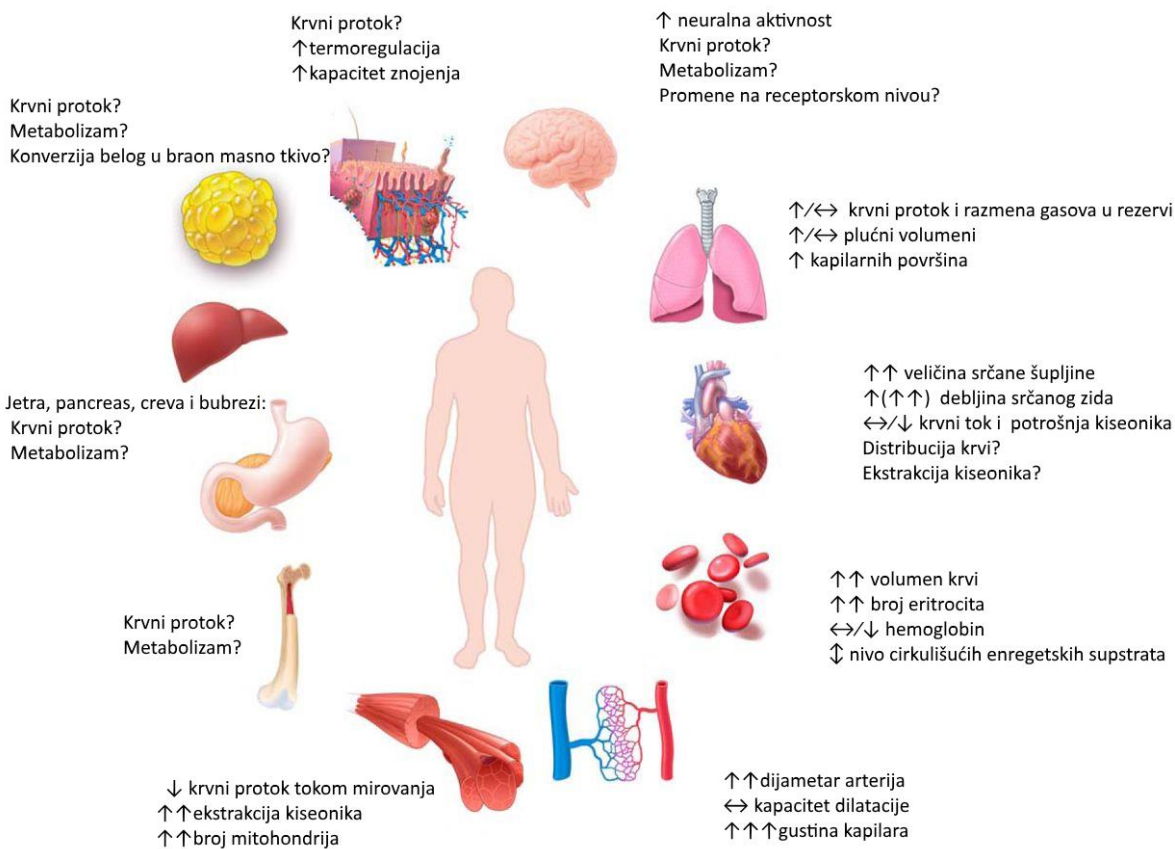
Stanju sistemske inflamacije doprinosi i povećanje intestinalne permeabilnosti, kao posledica redukovane ekspresije proteina koji grade tesne međućelijske veze (eng. *tight junctions*). Ova pojava je izražena u sportskoj populaciji, i nastaje usled mehaničkih oštećenja uzrokovanih smanjenim krvnim protokom i povišenom temperaturom organizma tokom intenzivne FA (Pyne i sar, 2009). Naime, aktivacija simpatičkih α -adrenoreceptora, uzrokuje vazokonstrikciju u području splanhikusa, nakon čega se krv redistribuira u organe kao što su srce, mišići i pluća (van Wijck i sar, 2012). Redukovana perfuzija splanhičnih organa uzrokuje ishemiju i hipoperfuziju enterocita i ograničenu dostupnost molekula ATP-a, što vodi ka oštećenju intestinalnih epitelnih ćelija (IEĆ). Narušavanje integriteta GIT sluznice se može produbiti i nakon prekida intenzivne FA, jer ponovno uspostavljanje krvnog protoka, tj. reperfuzija lokalnog tkiva pokreće kaskadu oksidativnih i inflamatornih procesa (van Wijck i sar, 2012). Ishemija GIT sluznice uzrokuje i oštećenje Panetovih ćelija, koje sekretuju antimikrobne

proteine (AMP) u lumen creva, s ciljem sprečavanja translokacije bakterija (van Wijck i sar, 2012). Skorašnja istraživanja su pokazala da procesi koji nastaju usled ishemije i reperfuzije GIT-a uzrokuju apoptozu Panetovih ćelija (van Wijck i sar, 2012). Stoga, posledično „curenje“ antigena (veliĉine molekula i >150 kD) iz lumena creva kroz paracelularne prostore enterocita, dovodi do bakterijske endotoksemije i hroniĉne inflamacije, nelagodnosti u GIT-u, a moŹe i da rezultuje infekcijama, pa ĉak i autoimunskim bolestima (DeOliveira et Burini, 2011). Neki autori smatraju da oštećenost GI fukcije tokom intenzivne FA moŹe rezultovati i redukcijom digestije i apsorpcije nutrijenata i do 80% (van Wijck i sar, 2012). Ipak, za sada postoji mali broj dokaza za ovo tvrđenje, i to se mora detaljnije ispitati u budućim istraŹivanjima.

Modifikacije mikrobiote izazvane FA ostvaruju efekte na razne aspekte imuniteta i metabolizma. FA dovodi do povećanja diverziteta mikrobiote, što se generalno smatra vaŹnim faktorom održanja zdravlja domaćina (Mach i Fuster-Botella, 2016). Naime, skorašnja opservaciona studija je pokazala da je u bakterijskom profilu uzoraka fecesa profesionalnih ragbista u većoj meri izraŹen divezitet mikrobiote u odnosu na sedentarne osobe (Clarke i sar, 2014). Takođe, uoĉena je veća zastupljenost roda *Akkermansia*, koji se povezuje sa zdravim metaboliĉkim profilom, u odnosu na kontrolu sa visokim indeksom telesne mase (ITM) (Clarke i sar, 2014).

Nezavisno od modulacije sastava mikrobiote, intenzivna FA ispoljava kompleksni uticaj na imunski sistem, izazivajući tranzitne i dugoroĉne posledice po različite komponente imunskog sistema, što dalje ima negativne implikacije u domenu infekcija, pre svega gornjeg respiratornog trakta (Walsh i sar, 2011). Razvitak modernih laboratorijskih tehnika omogućio je bolje razumevanje sloŹenih mehanizama vezanih za neuro-endokrine, biohemijske i imunološke efekte FA, ali dalja prouĉavanja u ovoj oblasti su neophodna. Pokazano je da je za održavanje normalne imunske funkcije neophodno optimalnom i raznovrsnom ishranom zadovoljiti potrebe organizma za makro- i mikronutrijentima (Gleeson, 2016). Posebno mesto u primarnoj i sekundarnoj prevenciji negativnih posledica intenzivne FA zauzimaju dijetarne intervencije. U tom smislu, tokom poslednjih nekoliko decenija sproveden je veliki broj kliniĉkih studija, gde je ispitivan uticaj nutritivnih i nenutritivnih sastojaka na promene u imunitetu uzrokovanih intenzivnom FA: upotreba ugljeno-hidratnih napitaka, beta-glukana, razliĉitih antioksidanasa, cinka, glutamina, ehinacee i kolostruma (Gleeson, 2016). Ipak, posebnu paŹnju sportskih imunologa su zauzeli

probiotski sojevi. Upravo zato je soj *Lactobacillus helveticus* L10 i predmet istraživanja ove doktorske disertacije.

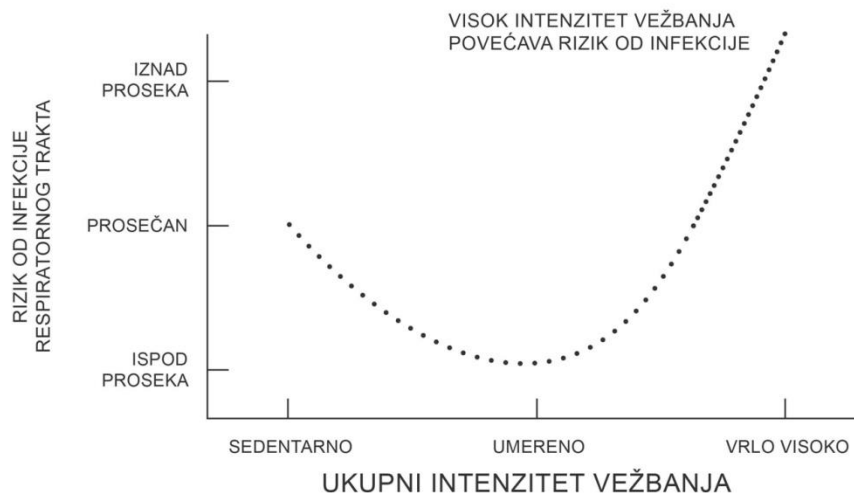


Slika 1. Dugoročni efekti intenzivne fizičke aktivnosti na organizam (preuzeto iz Heinonen i sar, 2014)

1.1.1 Uticaj FA na imunitet

Zavisnost zdravstvenih efekata od intenziteta FA, predstavljena tzv. U-krivom pominje se prvenstveno u kontekstu respiratornog trakta (Slika 2). Naime, centralno mesto u doktrini sportske imunologije predstavlja postojanje povećanog rizika infekcija gornjeg respiratornog trakta u populaciji vrhunskih sportista. Drugim rečima, smatra se da rizik opada sa porastom intenziteta FA do određenog nivoa, a da zatim raste sa daljim povećanjem FA, što se pripisuje

promenama pre svega mukoznog imuniteta, ali i činilaca stečenog i urođenog imunskog sistema (Walsh i sar, 2011).



Slika 2. J-kriva: zavisnost učestalosti javljanja respiratornih infekcija gornjih puteva od intenziteta FA (preuzeto iz Nieman, 1990)

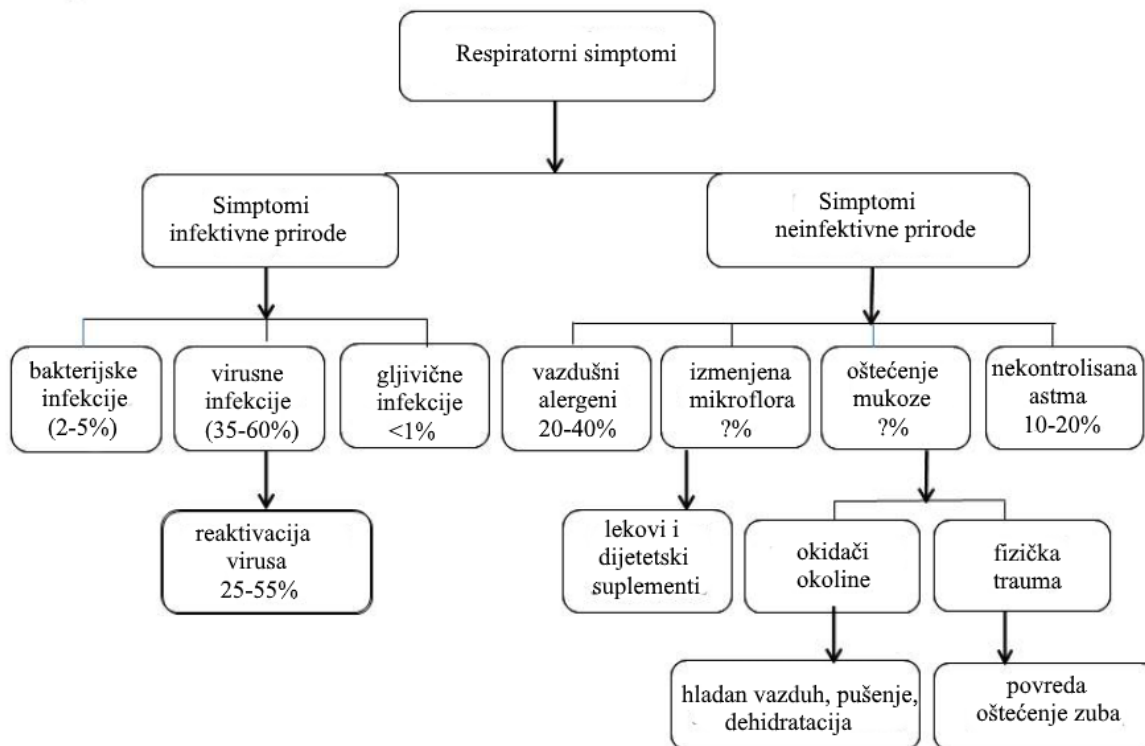
Najčešći respiratorni simptomi podrazumevaju kijanje, bol i grebanje u grlu, umor, glavobolju i uglavnom se leče dijetetskim suplementima ili lekovima bez recepta u svrhu olakšanja (Gleeson i Pyne, 2016). Međutim, iako respiratorne infekcije predstavljaju 35-65% slučajeva prakse sportske medicine, potrebno je naglasiti da većina respiratornih simptoma prijavljenih od strane sportista ipak nije infektivne prirode: samo trećina respiratornih simptoma javlja se kao posledica patogenih uzročnika, čija je distribucija slična kao i u opštoj populaciji (Gleeson i Pyne, 2016). Interesantno je da je čak trećina respiratornih simptoma „nepoznate etiologije“: pretpostavka je da se javljaju kao posledica mehaničkog ili fizičkog oštećenja disajnih puteva, delovanja inflamatornih citokina i produkata neuro-endokrinoloških reakcija indukovanih oštećenjem mišića usled intenzivnog treniranja itd. Najčešće su infekcije virusnog porekla, koje čine 30-55% slučajeva infekcija, dok su bakterijski uzročnici retki i čine svega 5% svih slučajeva respiratornih infekcija u populaciji sportista. Konačno, trećina respiratornih simptoma je inflamatorne prirode, a nastaje kao imunski odgovor na lokalnu infekciju, alergiju, astmu, autoimuno oboljenje, ili oštećenje respiratornog epitelijuma usled narušavanja integriteta mukozne membrane (Gleeson i Pyne, 2016).

Određene retrospektivne i prospektivne longitudinalne studije ukazuju na činjenicu da respiratorne infekcije ne prate sezonske varijacije prisutne u opštoj populaciji (Hellard i sar, 2015). Naime, učestalost infekcija se posebno povećava u doba intenzivnijih treninga pre i tokom takmičenja, što se može neaktivno odraziti na sportske rezultate i performanse (Gleeson i Pyne, 2016). Međutim, ova tvrdnja je takođe specifična za vrstu sporta i zabeležena je prvenstveno u populaciji plivača (Hellard i sar, 2015), dok je npr. u populaciji maratonaca povišena incidenca respiratornih infekcija prisutna nakon takmičenja (Neiman i sar, 2006). Takođe, u populaciji plivača je primećen povećani rizik respiratornih infekcija posebno u zimskoj sezoni, usled izloženosti hladnom vazduhu (Hellard i sar, 2015).

Međutim, novija istraživanja dovode u pitanje prirodu zavisnosti FA i učestalosti respiratornih infekcija u populaciji vrhunskih sportista. Publikovani rezultati novijeg datuma ukazuju na kompleksniju sliku etiologije respiratornih infekcija, ukazujući na značajnost genetske predispozicije (prisustvo IFITM3 i Mx1 gena), pola, vrste sporta, bihevioralnih faktora: psihičkog stresa, čestih putovanja i takmičenja, džet lega, nedostatka sna itd. (Walsh i Oliver, 2016). Interesantno, rezultati prospektivne studije su pokazali inverznu korelaciju učestalosti respiratornih infekcija sa intenzitetom FA, ali direktnu povezanost sa stepenom psihičkog stresa (Fondell i sar, 2011). Pored toga, utvrđena je i veća incidenca URTI u populaciji sportista koji se takmiče na nacionalnom u odnosu na sportiste koji se takmiče na internacionalnom nivou, što se povezuje sa različitim stepenom edukacije i načinom života (izbegavanje infekcija, održavanje higijene, dužina sna, ishrana) (Walsh i sar, 2011; Hellard i sar, 2015).

Do nedavno, „zlatni standard“ za utvrđivanje uzroka bolesti gornih respiratornih puteva bio je pregled lekara, koji je obuhvatao procenu kliničkih simptoma i znakova, ali ne i mikrobiološke analize briseva grla i nosa. Danas se ovakav način procene respiratornih simptoma ne smatra idealnim. Pored toga, lekari su retko uključeni u studije sportske imunologije, a većina studija se bazira na beleženju respiratornih simptoma na osnovu samoprocene sportista. Upravo ovo predstavlja najveći nedostatak studija koje se bave ovom tematikom (Gleeson i Pyne, 2016). Buduće studije treba da uključe mikrobiološke analize uzoraka ispitanika, ali i novije imunološke, biohemijske i molekularne metode za sveobuhvatnije razumevanje genetskih i psiholoških faktora, kao i uticaja sredine na osetljivost sportista na respiratorne infekcije.

Na Slici 3 dat je prikaz etioloških faktora respiratornih simptoma u populaciji sportista (preuzeto iz Gleeson i Pyne, 2016).

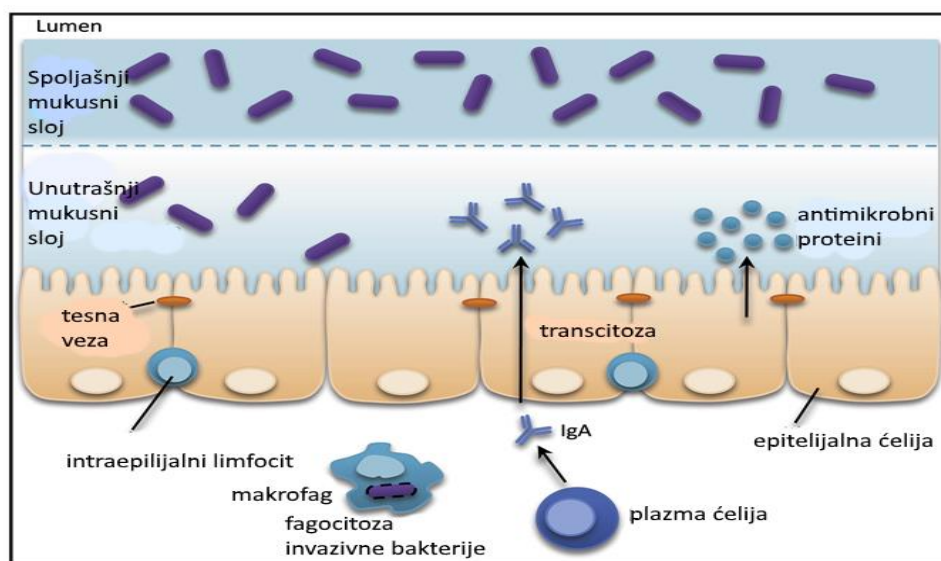


Slika 3. Etiologija respiratornih simptoma u populaciji sportista (preuzeto iz Gleeson i Pyne, 2016)

Uticaj FA na mukozni imunitet

Prva linija odbrane sa kojom se susreću patogeni pri ulasku u organizam je intestinalna mukozna barijera, čija je uloga da zaustavi njihov prodor u ekstraintestinalna sterilna tkiva (Walsh i sar, 2011). Pored toga, mukozna barijera ima značajnu ulogu u urođenom imunskom sistemu, s obzirom na to da učestvuje u pokretanju kaskade imunskih reakcija, kao odgovor na bakterijsku invaziju i metabolički stres. Na taj način ona predstavlja deo sistema uzbune za imunske ćelije u lamini proprijii u borbi protiv patogena. Naime, mukozni imunitet čine tri glavne komponente: fizička, koja obuhvata epitelne ćelije povezane tesnim vezama i tanak sloj mukusa, zatim hemijska, čiji su glavni činoci AMP i imunska, koja se sastoji od dendritskih ćelija,

makrofaga i B ćelija koje sekretuju IgA antitela (Yu i sar, 2012). Peharaste ćelije GIT-a sekretuju mukus, koji prekriva čitavu površinu intestinalnog epitela (Sommer i Backhed, 2013). Molekuli glikopeptida koji grade mukus obezbeđuju konzistenciju gela, otežavajući na taj način prodor bakterija ka epitelnim ćelijama. Sloj mukusa se sastoji od dva različita sloja: gornjeg, koji sadrži veliki broj bakterija i donjeg, koji je rezistentan na bakterijsku kolonizaciju (Duerkop i sar, 2009). AMP: α – amilaza, laktoferin i lizozim, čine prvu liniju odbrane od infektivnih agenasa. Ovi prirodni antimikrobni agensi poseduju širok spektar antipatogene aktivnosti usmerenih protiv Gram+ i Gram- bakterija, gljivica, kvasaca i virusa (De Smet i Contreras, 2005). Antibakterijsku aktivnost ostvaruju preko mehanizama narušavanja integriteta ćelijskog zida (Hooper, 2009). Međutim, najvažniji činilac mukoznog sistema su salivarna IgA (sIgA) antitela, koja ostvaruju svoju odbrambenu ulogu kroz proces transcitoze u obliku kompleksa sa polimernim IgA receptorima (pIgR) na tri načina: sprečavanjem prianjanja patogena za mukoznu površinu i dalji prodor kroz mukozni epitel, neutralizacijom virusa u epitelnim ćelijama tokom procesa transcitoze i izlučivanjem lokalno formiranih imunskih kompleksa na luminalnu površinu (Lamm, 1998). Komponente mukoznog imuniteta predstavljeni su na Slici 4.



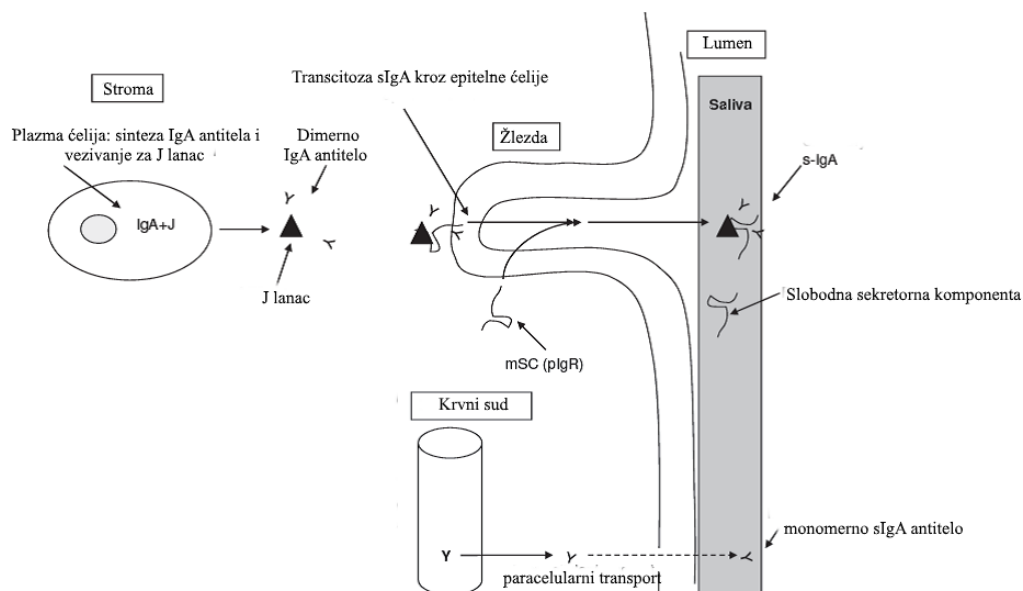
Slika 4. Komponente mukoznog imuniteta (preuzeto iz Duerkop i sar, 2009)

Tokom poslednjih 30 godina vodi se diskusija oko kliničkog značaja tranzitnih i dugoročnih promena imunoških markera tokom intenzivne FA. Ipak, jedino je u domenu mukoznog imunskog sistema postignut konsenzus pri razjašnjenju negativnog uticaja FA na

imunitet sportista. Činioci mukoznog imuniteta: apsolutna koncentracija i brzina sekrecije salivarnih IgA antitela jedini su imunološki parametri koji pokazuju konzistentnu vezu sa rizikom URTI u sportskoj populaciji (Walsh i sar, 2011). Utvrđena je inverzna korelacija između nivoa mukoznog imuniteta i intenziteta FA (Walsh i sar, 2011). Većina studija koje su se bavile ovom tematikom pokazala je da intenzivno treniranje značajno smanjuje nivo sIgA antitela. Takvi nalazi su zabeleženi kod maratonaca (Nieman, 2002), kajakaša (Mackinnon i sar, 1993), plivača (Gleeson i sar, 1999), kao i nakon „Wingate testa“ (test za merenje maksimalne snage i anaerobnog kapaciteta) (Fahlman i sar, 2001). Koncentracija sIgA antitela u salivi se vraća na nivo pre treninga u toku 24 h, međutim, ukoliko nakon treninga ekstremnog intenziteta ne postoji odgovarajući odmor, sniženi nivo se može zadržati i tokom dužeg perioda (Walsh i sar, 2011). Suprotno tome, primećeno je umereno povećanje nivoa sIgA nakon kratkotrajnih perioda umerene FA, što bi zapravo moglo da objasni nisku incidencu URTI u populaciji koja se redovno bavi umerenom FA (Walsh i sar, 2011). Ipak, drugi autori nisu utvrdili promene nivoa sIgA antitela nakon ragbi meča (Koch i sar, 2007), a slični rezultati su zabeleženi i nakon fudbalske utakmice (Moreira A, 2009). Takođe, tronedeljni kurs izdržljivosti nije doveo do smanjenja koncentracije sIgA antitela u populaciji vojnika (Tiollier i sar, 2005). Međutim, treba skrenuti pažnju da se metodologija sakupljanja salive često razlikuje među studijama (nestimulisana, stimulisana, stimulisana parotidna saliva, mešovita saliva), čime se otežava poređenje rezultata.

Iako postoje dovoljni dokazi inverzne povezanosti nivoa sIgA antitela sa intenzitetom FA, mehanizam ove interakcije još uvek nije dovoljno razjašnjen (Slika 5). Takođe, potrebno je naglasiti da su uvid u mehanizam ove interakcije dale animalne studije (Walsh i sar, 2011). Naime, brzina sekrecije sIgA antitela je određena procesom njihove produkcije od strane B ćelija u submukozi i/ili procesom transepitelnog transporta kompleksa sIgA-pIgR, koji zavisi od dostupnosti pIgR (Bosch i sar, 2002). Stimulacija simpatičkog nervnog sistema (SNS) vrši ushodnu regulaciju pIgR ekspresije, povećavajući brzinu sekrecije sIgA, tj. dovodi do porasta koncentracije sIgA antitela nakon akutne FA (Proctor i sar, 2003). Međutim, hronična i/ili dugotrajna FA, tj. produžena simpatička stimulacija i/ili visok nivo kateholamina u krvi uzrokuje učestaliju mobilizaciju pIgR i dovodi do praznjenja pula sIgA (Bishop i sar, 2006, Walsh i sar, 2011). Posledica je smanjena koncentracija sIgA antitela. Takođe, ostali spoljašnji faktori koji pokreću aktivaciju SNS, npr. psihički stres, trudnoća, menstrualni ciklus, lekovi, nedostatak sna,

džet leg, mogu uticati na nivo sekretornog IgA (Walsh i sar, 2011). Pored toga, nivo IgA zavisti i od starosti organizma.



Slika 5. Mehanizam transepitelnog transporta sIgA antitela (preuzeto iz Walsh i sar, 2011)

Uticaj FA na urođeni imunitet

Urođeni imunitet je prva linija odbrane organizma od patogena. Najvažnije medijatori urođenog imunskog sistema su mononuklearne fagocitne ćelije (monociti i makrofage), NK ćelije (eng. *Natural Killer Cells*, NK) i dendritske ćelije, ali i IEC, kao i sekretovani citokini (Walsh i sar, 2011). Iako se u praksi radi lakšeg razumevanja i proučavanja, urođeni i stečeni imunitet posmatraju posebno, oni zapravo predstavljaju neodvojivu celinu. Uprkos potencijalno važnoj ulozi u patogenezi respiratornih infekcija, čini se da još uvek postoji veliki broj nesuglasica oko uticaja FA na urođeni imunitet. Tome još treba pridodati razlike između efekata akutne i hronične, odnosno umerene i intenzivne FA.

Na Slici 6 dat je šematski prikaz veze između FA i činilaca urođenog imuniteta. Faktori indukovani FA: oksidativni stres, ubrzanje bazalnog metabolizma, aktivacija proteina koji se aktiviraju kao odgovor na stres (eng. *heat shock* proteini), povišen nivo kateholamina (usled

aktivacije simpatikusa), kortizola i insulinu sličnog faktora rasta mogu da utiču na prepoznavanje patogena promenom ekspresije TLR (eng. *Toll-like receptors*) ili *scavenger* receptora (Walsh i sar, 2011). Pored toga, ovi faktori uzrokuju redistribuciju leukocita menjanjem hematopeze, indukcijom apoptoze i ekspresijom adhezionih molekula. Konačno, menjaju se i efektorske funkcije ekspresije citokina, antigenske prezenacije, kao i produkcije ROS u cilju odbrane od patogena (Walsh i sar, 2011).

U narednom odeljku dat je prikaz dosadašnjih saznanja o uticajima FA na činioce urođenog imuniteta.



Slika 6. Šematski prikaz uticaja FA na urođeni imuni sistem (preuzeto iz Walsh i sar, 2011)

Neutrofili

Akutna FA rezultira prvim naglim talasom neutrofilije, usled aktivacije SNS-a. Nakon nekoliko sati, sledi drugi odloženi talas, uzrokovan povišenim nivoom kortizola koji oslobađa neutrofile iz koštane srži (McCarthy i sar, 1992; Robson i sar, 1999; Peake, 2002). Međutim, novooslobođeni neutrofili poseduju nižu sposobnost fagocitoze od cirkulišućih neutrofila. Iako akutna sesija treninga povećava sposobnost neutrofila da vrše fagocitozu i produkciju slobodnih

radikala, čini se da hronična intenzivna FA, pogotovu ukoliko ne postoji odgovarajući odmor, smanjuje njihovu funkcionalnost. Pokazano je da naporni treninzi uzrokuju oštećenje sposobnosti degranulacije i stvaranja ROS prilikom odgovora na bakterijske patogene (Robson i sar, 1999). Iako ovo stanje može trajati i do nekoliko dana, za sada nema dovoljno dokaza da smanjena funkcija neutrofila tokom hronične intenzivne FA uzrokuje povećanu učestalost respiratornih infekcija.

Monociti/makrofage

Kratkotrajna monocitoza se javlja u periodu od 2 h nakon akutne FA i najverovatnije je uzrokovana mobilizacijom monocita iz vaskularnog endotela, hemodinamskim promenama ili povišenim nivoima kortizola i kateholamina (Krueger K i Mooren, 2007; Okutsu i sar, 2008). Akutna FA menja fenotip cirkulišućih monocita, zatim površinske molekule monocita, kao i ekspresiju citokina. Npr. akutna FA uzrokuje mobilizaciju CD14+/CD16+ monocita u krvotok. Ova populacija monocita poseduje veću pro-inflamatornu sposobnost u odnosu na cirkulišuće CD14+/CD16- monocite (Hong i Mills, 2008). Ipak, u periodu oporavka, ponovo se vrši njihova distribucija u tkiva (Simpson i sar, 2009). Pored toga, utvrđeno je da FA redukuje ekspresiju TLR1, 2 i 4 na površini CD14+ monocita, ali još uvek nije poznato u kom obimu. Usled redukcije ekspresije TLR receptora, primećena je smanjena produkcija pro-inflamatornih citokina IL-6, IL-1 α i faktora nekroze tumora α (eng. *Tumor Necrosis Factor- α* -TNF- α) (Lancaster i sar, 2005).

Promena u funkciji monocita ne mora da predstavlja odraz funkcije makrofaga. Animalne studije su pokazale da umerena i intenzivna akutna FA ipak može da stimuliše fagocitozu, antitumorsku aktivnost, metabolizam ROS i hemotaksu, dok sa druge strane, produžena FA smanjuje ekspresiju MHCII molekula na površini makrofaga (Ortega i sar, 1996; Ceddia etal, 2000). U tom smislu pokazana je oštećena antiviralna aktivnost alveolarnih makrofaga, koja je korelirala sa povećenom incidencom *Herpes simplex* infekcija (Kohut i sar, 1998). Pored toga, pretpostavlja se da je ovakav imunski odgovor na FA dozno-zavisan i da je posredovan dejstvom kateholamina, ali ne i kortizola. Ipak, potrebno je naglasiti da su navedeni efekti primećeni u animalnim studijama i da se moraju potvrditi i u humanim studijama.

Što se tiče efekata hronične FA, zabeležena su oprečna dejstva na nezrele monocite u cirkulaciji i diferencirane makrofage u tkivima. Naime, longitudinalne i studije preseka su pokazale da fizički aktivne osobe poseduju niže nivoe “inflamatornih” CD14+/CD16+ monocita, smanjenu ekspresiju TLR4 receptora i oštećeni odgovor monocita nakon stimulacije antigenom LPS (lipopolisaharid) (McFarlin i sar, 2006; Flynn i sar, 2003). S obzirom na relativno mali udeo monocita u ukupnoj populaciji leukocita, nije poznato u kojoj meri navedeni efekti doprinose anti-inflamatornom dejstvu FA. Suprotno tome, animalne studije su pokazale da redovna FA pojačava inflamatorne efekte peritonealnih makrofaga (Kizaki i sar, 2008), što ukazuje na mogućnost razlike u efektima između cirkulišućih i diferenciranih makrofaga u tkivima. Naime, dve animalne studije su ukazale da FA sprečava infiltraciju makrofaga u visceralno adipozno tkivo kod miševa na nisko-masnoj i standardnoj ishrani, dok kod miševa na režimu visoko masne ishrane doprinosi sniženju sistemske inflamacije (Vieira i sar, 2009a; Vieira i sar, 2009b). Ovo ukazuje na anti-inflamatorni potencijal FA, koji je potreban u prevenciji hroničnih inflamatornih stanja. Nasuprot tome, smanjeno prisustvo makrofaga na mestu infekcije nije poželjno. Kao i u slučaju neutrofila, za sada nije poznato da li efekti intenzivne FA na funkciju monocita i makrofaga imaju učešće u patogenezi respiratornih infekcija.

(Natural killer) NK ćelije

Veliki broj studija se bavio uticajem FA na broj i funkciju NK ćelija (CD3-CD16+CD56+). Kao i u populaciji ostalih leukocita, akutna FA izaziva prolaznu i brzu mobilizaciju NK ćelija u cirkulaciju. Ovaj proces je posredovan dejstvom kateholamina, koji uzrokuju nishodnu regulaciju ekspresije adhezionih molekula (Timmons i Cieslak, 2008). Međutim, u ovoj redistribuciji uglavnom učestvuju CD56^{dim} ćelije, dok je populacija CD56^{bright} ćelija manje osetljiva. U datom kontekstu odgovor organizma na patogene može biti smanjen tokom akutne FA, s obzirom na veći citotoksični potencijal CD56^{bright} ćelija. Sa druge strane, nakon produžene FA, smanjuje se ukupan broj NK ćelija u cirkulaciji, ali raste udeo populacije CD56^{bright} ćelija (Timmons i sar, 2006). Ipak, za sada nisu poznati zdravstveni efekti opisanih promena cirkulišućih NK ćelija.

Bitan parametar funkcionalne aktivnosti NK ćelija je citotoksičnost (engl. *NK cells cytotoxicity* - NKCC). Određene studije su pokazale da nivo NKCC raste za 50-100% odmah

nakon FA usled rasta broj NK ćelija u cirkulaciji (Wood i sar, 1998). Izražavanjem nivoa NKCC po broju NK ćelija, dolazi se do zaključka da nema značajnih promena u nivou NKCC, osim u slučaju intenzivnog i produženog treniranja. Tada i funkcija NK ćelija može biti kompromitovana i do nekoliko sati i potencijalno predstavlja “otvoren prozor” za infekcije (Gleeson i Bishop, 2005). Pokazano je da se nakon FA menja sposobnost NK ćelija da produkuju IL-2 i IFN- γ nakon antigenske stimulacije (Wood i sar, 1998). Ipak, ovi rezultati, kao i u slučaju NKCC, najverovatnije predstavljaju efekte redistribucije NK ćelija u druge delove imunskog sistema, ali ne i izmenjenu funkciju NK ćelija.

Što se tiče uticaja hronične FA na NK ćelije, brojna istraživanja su dala prilično nekonzistentne i kontradiktorne rezultate. Rane studije preseka i intervencione studije sa malim brojem ispitanika ukazale su na umeren porast nivoa NKCC sedentarne populacije nakon uvođenja umerene FA. Međutim, velika studija koja je trajala 12 meseci nije uočila promene u NKCC u populaciji post-menopauzalnih žena nakon treniranja umerenog intenziteta (McFarlin i sar, 2006; Campbell i sar, 2008). Nasuprot tome, intenzivna FA najverovatnije smanjuje NKCC i umanjuje udeo populacije NK ćelija (Gleeson i sar, 1995).

Iz svega navedenog sledi da i nakon brojnih istraživanja uticaja FA na broj i citotoksičnost NK ćelija, konačni zaključci nisu doneti.

Dendritske ćelije (DĆ)

I pored važnosti DĆ u indukciji imunskog odgovora na patogene, nije pokazan naučni interes za uticaj FA na ovu populaciju ćelija. Sprovedene su jedino dve studije koje su se bavile ovom tematikom. Liao i sar, 2006 je ukazao na povećanje broja DĆ nakon akutne FA, dok je Chiang i sar, 2007 zabeležio pojačanu ekspresiju MHC molekula II klase i povišenu produkciju IL-12 u mišjem modelu nakon FA.

Na osnovu pregleda dostupne literature, dolazi se do zaključka da je interesantna tema hroničnih i akutnih efekata FA na urođeni imunski sistem tek začeta. Ključno pitanje na koje treba tek odgovoriti je da li FA dovodi do redistribucije različitih populacija leukocita između različitih “delova” imuniteta, i da li ova pojava ima implikacije u smislu povećane osetljivosti na infekcije.

Uticaj FA na stečeni imunitet

Akutna FA izaziva bifazni odgovor limfocita, koji je proporcionalan intenzitetu i u manjoj meri dužini trajanja FA. Tako se limfocitoza javlja tokom i odmah nakon FA, nakon čega sledi pad broja limfocita ispod bazalnih vrednosti u periodu oporavka. Ipak, nakon nekoliko sati, broj limfocita u krvi se normalizuje. Ovakav obrazac je uočen u populaciji T limfocita, i u populaciji B ćelija u manjoj meri (Walsh i sar, 2011). Međutim, bifazni odgovor se može intenzivirati ukoliko ne postoji odgovarajući odmor nakon intenzivne FA. Mobilizacija T i B ćelija je posredovana uticajima adrenalina, i to direktnim efektima na ekspresiju adhezionih molekula iz porodice integrina i selektina, ali i indirektnim simpatičkim dejstvom na minutni volumen i krvni protok (Shephard, 2003) (Slika 7). Limfociti ekspresiraju β_2 adrenergičke receptore, a njihova gustina je proporcionalna intenzitetu FA i izloženosti dejstvu kateholamina (Shephard, 2003). Najveća ekspresija ovih receptora nađena je na površini NK ćelija, zatim na CD8⁺ i B ćelijama, dok ih najmanje ima na površini CD4⁺ limfocita. Različita zastupljenost receptora na površini imunokompetentnih ćelija uzorkuje i različit obim mobilizacije limfocita u krv kao odgovor na FA (Walsh i sar, 2011).

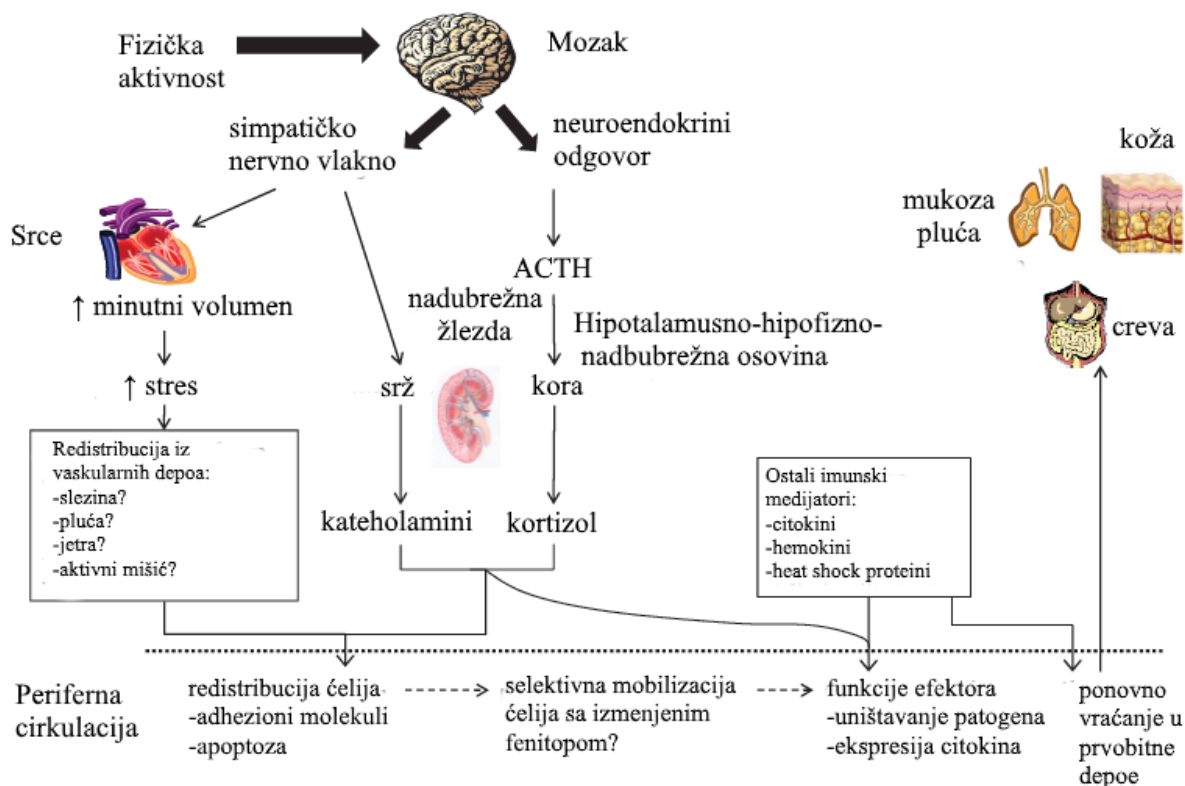
Sniženje T limfocita uglavnom je uzrokovano padom Th1 ćelija, s obzirom na manju osetljivost Th2 limfocita na dejstvo FA. Ipak, još uvek nije sasvim razjašnjeno da li je sniženje nivoa cirkulišućih Th1 limfocita uzrokovano apoptozom ili redistribucijom u druge delove imunskog sistema (Steensberg i sar, 2001). Stoga, produžena intenzivna FA suprimira aktivnost T ćelija, prevashodno Th1 limfocita, vodeći ka narušavanju Th1/Th2 ravnoteže. Th1 ćelije igraju esencijalnu ulogu u regulaciji odgovora organizma na intracelularne patogene, stoga oštećenost njihove funkcije može uzrokovati učestalu pojavu respiratornih infekcija. Pored toga, brojne studije su pokazale da akutna FA uzorkuje smanjenje proliferacije limfocitnih populacija nakon *in vitro* stimulacije mitogenom ili antigenom (Walsh i sar, 2011), što se povezuje sa povećanim oksidativnim stresom, ali i povišenim koncentracijama kortizola i adrenalina.

Sa druge strane, FA narušava i adekvatan odgovor humoralnog imunskog sistema. B limfociti nakon proliferacije i diferencijacije u memorijske i plazma ćelije sekretuju antitela specifična za antigen koji je provocirao odgovor. *In vitro* antigenska i mitogenska stimulacija B ćelija je pokazala da se nivo IgM antitela povećava u serumu, nezavisno od broja T i B ćelija,

dok su rezultati za IgA i IgG antitela kontradiktorni (Nieman i Nehlsen-Cannarella, 1991; Shek i sar, 1995). Međutim, sniženje koncentracije T i B ćelija ne mora obavezno da podrazumeva i smanjen odgovor organizma na intracelularne patogene, s obzirom na izvanrednu sposobnost adaptacije imunskog sistema, tj. aktivacije njegovih drugih delova. Novije studije ukazuju na veliki značaj citokina u plejotropnim efektima na limfocite, makrofage i ostale imunokompetentne ćelije, kao odgovor na intenzivnu FA (Gleeson i Bishop, 2013). U tom smislu, anti-inflamatorni interleukin-10 (IL-10) se pominje kao jedan od esencijalnih faktora za povećanu incidencu respiratornih infekcija u populaciji sportista (Gleeson i Bishop, 2013). Nivo IL-10 je povećan kod sportista koji intenzivno treniraju (Gleeson i sar., 2013), dok je sekrecija IL-10 nakon antigenske stimulacije značajno korelirala sa brojem respiratornih simptoma i dužinom njihovog trajanja (Gleeson i sar., 2012, Gleeson i sar., 2013). IL-10 inhibira Th1 odgovor tokom viralnih infekcija (Maynard i Weaver, 2008), suprimirajući sekreciju pro-inflamatornih citokina IFN- γ i IL-12, i aktivaciju APC (Maynard i Weaver, 2008). IL-10 sintetišu mnoge ćelije urođenog i stečenog imuniteta, uključujući Th2, regulatorne ćelije (Treg), monocite, makrofage, DC, B ćelije, CD8+ ćelije, Th1 i Th17 ćelije (Maynard i Weaver, 2008). Ipak, regulatorne ćelije CD4+CD25+FoxP3+ se smatraju primarnim izvorom IL-10 (Gleeson i sar., 2012), čiji se broj verovatno uvećava kao odgovor na regularnu intenzivnu FA (Gleeson i Bishop, 2013). Postoje dokazi koji ukazuju na uvećani broj cirkulišućih nivoa ovih ćelija nakon akutne FA i nakon dugotrajnog perioda intenzivne FA u animalnim studijama (Wang i sar, 2012). Povišene koncentracije Treg ćelija su takođe zabeležene i kod dizača tegova, i to čak 3 puta veće nego kod kontrolne grupe sedentarnih osoba (Nandakumar i sar, 2009). Postoji pretpostavka da diferencijacija Treg ćelija može biti indukovana pomoću IL-2, čiji je nivo povišen nekoliko sati nakon intenzivne FA (Gleeson i Bishop, 2013). Međutim, potrebno je još istraživanja, kako bi se potvrdila hipoteza indukcije Treg ćelija usled intenzivne FA dokazala.

Od ostalih anti-inflamatornih medijatora, koji mogu da inhibiraju Th1 odgovor prilikom virusnih infekcija, treba pomenuti interleukin 4 (IL-4) i transformišući faktor rasta 1 (engl. *transforming growth factor* 1, TGF- β 1). IL-4 je glavni interleukin u okviru Th2 odgovora, dok je viši nivo IL-4 nakon stimulacije antigenom utvrđen kod sportista sa visokim fizičkim opterećenjem i većom osetljivošću na respiratorne infekcije (Gleeson i sar, 2012). Sa druge strane, o posledicama FA na ekspresiju TGF- β 1 nema puno podataka. Ipak, skorija studija je ukazala na viši nivo CD4+TGF- β 1+ ćelija u populaciji maratonaca u odnosu na kontrolnu

sedentarnu populaciju (Rehm i sar, 2015), dok je indukcija TGF- β 1 zabeležena nedelju dana nakon maratonske trke (Rehm i sar, 2013).



Slika 7. Prikaz potencijalnih mehanizama FA na stećeni imunski sistem (preuzeto iz Walsh i sar, 2011) ACTH- adrenokortikotropni hormon

Akutna intenzivna FA izaziva supresiju nekoliko činilaca stećenog imuniteta, pre svega T limfocita, ali i ushodnu regulaciju ekspresije anti-inflamatornih citokina, koja traje i do 24 sata nakon treninga. Ukoliko ne postoji adekvatan odmor između uzastopnih sesija FA, kratkoročni supresivni efekti na funkciju limfocita mogu prerasti u hroničnu oštećenost stećenog imunskog odgovora. Kao i u slučaju urođenog imuniteta, potrebno je još istraživanja u ovoj oblasti, kako bi se utvrdio klinički značaj promena činilaca stećenog imuniteta uzrokovanih intenzivnom FA.

Uloga ishrane u održanju adekvatnog imunskog odgovora

Optimalna ishrana, koja ne podrazumeva samo zadovoljenje energetske potrebe i izbegavanje pojave deficita mikro- i makronutrijenata, treba da omogući i promociju zdravlja i obezbedi prevenciju bolesti. Kako ugroženo zdravstveno stanje može uticati na performanse sportista, poslednjih dvadesetak godina izvedene su brojne intervencione studije u cilju ojačanja imuniteta ove osetljive populacije. Za održanje imunskog sistema od posebnog značaja je adekvatan energetski unos, ali i unos proteina, s obzirom da je imunski odgovor posredovan molekulima proteinske prirode: imunoglobulinima, citokinima i proteinima akutne faze. Deficit pojedinih esencijalnih mikronutrijenata, kao što su bakar, gvožđe, mangan, magnezijum, selen, cink, vitamini A, D, C, E, B6, B12 i folna kiselina, takođe se vezuje za smanjenu otpornost organizma od bakterija i virusa tokom perioda intenzivnih treninga (Calder i Yaqoob, 2014; Gleeson, 2016).

Određene dijetarne intervencije mogu da pomognu u održanju funkcije imunskog sistema. Iako na tržištu postoji veliki broj dijetetskih suplemenata za ojačanje imunskog odgovora, mora se napomenuti da je većina dokaza koji potkrepljuju te tvrdnje zasnovana na rezultatima animalnih studija ili *in vitro* eksperimenata, kao i studija izvedenih u populaciji dece i starijih ljudi (Gleeson, 2016). Ipak, raste broj kliničkih studija koje se bave procenom efikasnosti dijetetskih suplemenata upravo u populaciji sportista. U nastavku je dat njihov kratak pregled.

Metabolički stres tokom intenzivnih treninga se može smanjiti održanjem nivoa glukoze u krvi. Utvrđeno je da unos sportskih pića sa visokom sadržajem ugljenih hidrata tokom intenzivne FA snižava nivo cirkulišućih kateholamina i kortizola, kao i anti-inflamatornih citokina (npr. IL-6 i IL-10), doprinoseći odlaganju simptoma zamora (Halson i sar, 2004). Pored toga, unos sportskih pića sprečava nastanak dehidracije, koja se javlja kao odgovor na dejstvo hormona, ali održava i salivarni protok. Naime, pad salivarnog protoka u kombinaciji sa pojavom dehidracije ugrožava sekreciju važnih anti-mikrobnih molekula sIgA, defensina, lizozima, α -amilaze i laktoferina (Fortes i sar, 2012).

Adekvatan unos proteina ima značajnu ulogu u sportskoj ishrani (1,2-1,6 g/kg telesne mase), kako kroz obroke, tako i nakon svake sesije treninga i u vreme odlaska na spavanje. Na ovaj način se sprečava oštećenje mišića, ali i održava adekvatna imunska funkcija (Morton i sar,

2015). Postoje dokazi da redovan unos proteina u periodu oporavka od intenzivnih treninga ublažava kratkoročne promene imunskih parametara i smanjuje pojavu respiratornih infekcija u populaciji vrhunskih sportista (Calder i Yaqoob, 2014; Witard i sar, 2014).

Postoji neslaganje među stručnjacima sportske medicine oko neophodnosti antioksidantne suplementacije, s obzirom na urođene sposobnosti organizma da se bori protiv slobodnih radikala. Ipak, određene studije pokazuju da unos relativno visokih količina antioksidantnih vitamina može da smanji nivo cirkulišućih kateholamina i kortizola tokom produženih treninga (Fischer i sar, 2004; Davison i Gleeson, 2006). Tako, npr. upotreba vitamina C (u dozama >200 mg), ili u kombinaciji sa vitaminom E, može smanjiti pojavu respiratornih infekcija, posebno u populaciji maratonaca (Douglas i sar, 2005).

Nakon otkrića receptora za vitamin D na T i B limfocitima, neutrofilima i antigenprezentujućim ćelijama (APC), začeta je ideja o važnoj ulozi vitamina D u regulaciji imunskog odgovora (Kamen i Tangpricha, 2010). I pored neslaganja stručnjaka oko optimalnog nivoa vitamina D u krvi, raste broj dokaza da je deficit ovog vitamina prisutan kod većine sportista. Deficit vitamina D se manifestuje oštećenom funkcijom mišića i smanjenom regenerativnom sposobnošću, ali i povećanjem rizika od frakture kostiju i pojave respiratornih infekcija (He i sar, 2013; Owens i sar, 2015). Vitamin D se dovodi u vezu sa citolitičkom aktivnošću NK ćelija, sintezom antimikrobnih proteina, sekrecijom citokina IL-1 β , regulacijom ekspresije CD14+ ćelija i receptora za LPS, kao i generisanjem ROS potrebnih za indukciju azot-monoksid sintaze (engl. *nitric oxide synthase*, NOS) u fagocitima (He i sar, 2013). Pored toga, utvrđena je inverzna korelacija između nivoa vitamina D i mukoznog imuniteta. Naime, suplementacija vitaminom D u dnevnoj dozi od 5000 IU izaziva povećanje nivoa sIgA antitela i AMP u salivi (He i sar, 2016).

Polifenoli, prirodni sastojci voća i povrća su poznati po svojim antioksidantnim svojstvima. Međutim, polifenoli pokazuju i anti-inflamatorna, kardio-protektivna i antimikrobna dejstva. Prospektivna studija sa velikim brojem ispitanika je ukazala na nižu incidencu respiratornih infekcija kod ispitanika koji unose veće količine voća i povrća (Nieman i sar, 2011). Ipak, kvercetin je zadobio najviše pažnje iz grupe polifenola u promociji zdravlja imunskog sistema u populaciji sportista. Tronedeljna suplementacija kvercetinom u dozi od 1000 mg smanjuje pojavu respiratornih infekcija u periodu nakon intenzivnih treninga, ali ne dovodi do promena u nivou sIgA antitela, aktivnosti NK ćelija i stimulisane proliferacije limfocita

(Nieman i sar, 2007). Ipak, potrebna su dalja istraživanja da bi se potvrdilo pozitivno dejstvo kvercetina u prevenciji respiratornih infekcija.

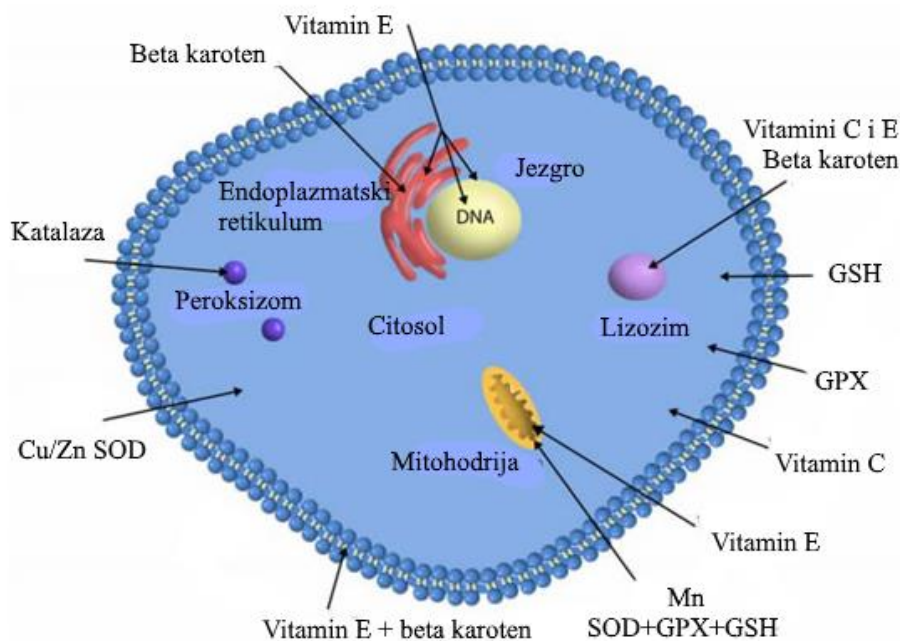
Goveđi kolostrum predstavlja smešu antitela, enzima, faktora rasta, glikosfingolipida, vitamina i minerala, i može se komercijalno naći u tečnom i praškastom obliku. Glikosfingolipidi mogu da modifikuju mikrobiotu, ali pokazuju i neke neposredne imunološke efekte. Suplementacija kolostrumom u trajanju od nekoliko nedelja može da poveća nivo salivarnih IgA antitela (Crooks i sar, 2006). Rezultati autora Davisona i Dimenta, 2010 ukazuju na održanje nivoa laktoferina u salivi i neutrofilne funkcije nakon perioda intenzivnih treninga. Pored toga, konzumacija kolostruma je povezana i sa redukcijom učestalosti respiratornih infekcija, kao i smanjenjem trajanja respiratornih simptoma u populaciji sportista (Crook i sar, 2006; Jones i sar, 2014).

Beta-glukani su polisaharidi koji se nalaze u ćelijskom zidu gljiva, kvasaca, bakterija i žitarica, kao što su ovas i ječam, a njihova sposobnost modulacije imuniteta zavisi od stepena polimerizacije (Brown i Gordon, 2003; Gleeson, 2016). Dokazi o efikasnosti beta-glukana u humanoj populaciji su oskudni; animalne studije su ukazale na sposobnost zaštite od virusnih infekcija nakon oralne administracije (Davis i sar, 2004; Volman i sar, 2008). Prema dostupnim literaturnim podacima, svega dve studije su izvedene u sportskoj populaciji: tronedeljna suplementacija nije ukazala na značajne imunološke efekte beta-glukana (Nieman i sar, 2008); dok je novija studija (McFarlin i sar, 2013) ukazala na smanjenje dužine trajanja respiratornih infekcija u periodu nakon maratona, što je pripisano povećanju nivoa sIgA.

Od ostalih suplemenata za održanje fukcije imunskog sistema koji se nalaze na tržištu treba pomenuti cink, ehinaceu, pelargoniju, vitamin E, ω -3 masne kiseline i glutamin (Gleeson, 2016). Međutim, za navedene preparate ne postoji dovoljan nivo dokaza o efkasnosti (Gleeson, 2016). Dijetetski suplementi koji zaokupljaju posebnu pažnju sportskih imunologa poslednjih nekoliko godina su probiotske kulture mikroorganizama, a o njima će biti reči u posebnom poglavlju.

1.1.2 Uticaj fizičke aktivnosti na oksidativni status

Oksidativni stres predstavlja stanje u kome je ravnoteža između nastanka slobodnih radikala i njihovog neutralisanja putem antioksidativnih zaštitnih mehanizama narušena i pomerena u smeru produkcije slobodnih radikala (Fisher-Welman K, 2009). Molekuli ili delovi molekula koje poseduju jedan ili više nesparenih elektrona u svojoj poslednjoj orbitali se nazivaju slobodnim radikalima. Podrazumevaju reaktivne kiseonične vrste (eng. *Reactive Oxygen Species* - ROS), ali mogu da sadrže atom azota (eng. *Reactive nitrogen species* - RNS) ili sumpora (eng. *Reactive Sulfur Species* - RSS) (Finaud J, 2006). Slobodni radikali se produkuju u aerobnim ćelijama, tokom odvijanja metaboličkih reakcija, a smatra se da njihov glavni izvor predstavljaju mitohondrije (Peternelj i Coombes, 2011).



Slika 8. Prikaz mehanizama antioksidativne zaštite (preuzeto iz Cabellero, 2004.)

Antioksidativnu zaštitu čine enzimski i neenzimski antioksidansi, koji generalno deluju na dva načina: sprečavaju nastanak slobodnih radikala ili reaguju sa slobodnim radikalima pre njihovog stupanja u reakciju sa esencijalnim biomolekulama. Na taj način sprečavaju ili

umanjuju oštećenje važnih bioloških sistema (Close DC, 2006). Efikasna antioksidantna zaštita je obezbeđena prisustvom antioksidanasa kako u intracelularnom, tako i u ekstracelularnom prostoru (Slika 8). Najosetljiviji biomolekuli na delovanje slobodnih radikala su proteini, masti i nukleinske kiseline (Teixeira i sar, 2009).

Neenzimski antioksidansi su jedinjenja male molekulske mase i sintetišu se u organizmu (glutation, bilirubin, mokraćna kiselina, glutathion, ferritin, ceruloplazmin) ili se unose putem hrane (vitamini A, C, E, karotenoidi, α -liponska kiselina, flavonoidi) (Peternej i Coombes, 2011). Antioksidativni enzimi katalizuju reakcije neutralizacije ROS u biološkom sistemu ili reakcije regeneracije, tj. redukcije oksidovanih antioksidanasa (Deaton CM, 2003). Ovi enzimi su uglavnom lokalizovani u sarkoplazmi matriksu mitohondrija. U ovu grupu spadaju:

- Superoksid dismutaza (SOD), enzim koji neutrališe superoksidni anjon i predstavlja prvu liniju odbrane od oksidativnog stresa;
- Glutation peroksidaza (GPX), koja katalizuje redukciju vodonik peroksida i organskih hidroperoksida u prisustvu redukovanog glutathiona (GSH) kao donora elektrona, dok se istovremeno formira oksidovani glutathion (GSSG);
- Glutation reduktaza (GR), koja učestvuje u regeneraciji glutathiona, tj. redukciji oksidovanog glutathiona u prisustvu NADPH (redukovani nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat) (Deaton i Marlin, 2003);
- Katalaza (CAT), enzim koji poseduje više funkcija, od kojih je najvažnija eliminacija vodonik-peroksida iz biološkog sistema razlaganjem na vodu i kiseonik. Ova reakcija se odvija u prisustvu jona gvožđa, koji je kofaktor vezan za aktivno mesto enzima (Finaud, 2006);
- Humana serumska paraoksonaza (EC 3.1.8.1, arildialkilfosfataza, PON1) je kalcijum-zavisna esteraza, koja se nakon sinteze u jetri sekretuje u krv, a zatim se vezuje za HDL (lipoproteini velike gustine, eng. *high density lipoprotein*) čestice (Otočka-Kmiecik i Orłowska-Majdak, 2009). PON1 sprečava oksidaciju LDL (lipoproteini male gustine, eng. *low density lipoprotein*) i HDL čestica posredovanu slobodnim radikalima. Smatra se da ovaj proces uključuje sledeće mehanizme: hidrolizu lipidnih peroksida sa oksidovanih LDL čestica (oxLDL) i aterosklerotskih lezija, zatim sprečavanje akumulacije holesterola u makrofagama posredstvom inhibicije biosinteze holesterola, kao i hidrolizu oksidovanih masnih kiselina sa fosfolipida u ćelijskim membranama različitih ćelija, uključujući i makrofage (Otočka-Kmiecik i Orłowska-Majdak, 2009). U datom kontekstu, jasno je da PON1 igra važnu ulogu u prevenciji

ateroskleroze, a novija istraživanja ukazuju i na smanjenu aktivnost ovog enzima u određenim patološkim stanjima, kao što su kardiovaskularne i bubrežne bolesti (Rajković i sar, 2010; Kotur-Stevuljevic i sar, 2008).

PON1 ima dva kodirajuća polimorfizma: supstitucija glutamina (Q) argininom (R) na poziciji 192 i supstitucija metionina (M) leucinom (L) na poziciji 55 (Humbert, 1993). Utvrđene su varijacije u afinitetima katalitičke aktivnosti odgovarajućih genotipova prema različitim nefiziološkim supstratima. Naime, uočene su supstrat-zavisne razlike između PON1Q i 192R izoformi: PON1R192 izoforma ima izraženiji afinitet prema paraoksonu kao sustratu u odnosu na PON1Q192. Prema dizaoksonu nije identifikovana ova razlika u PON192 izoformama, ali su reakcioni uslovi podešeni tako da smanjuju afinitet R varijante prema ovom supstratu (Otocka-Kmiecik i Orłowska-Majdak, 2009). Pored toga, utvrđene su fiziološke razlike između ova dva fenotipa: PON1Q192 fenotip je efikasniji u metabolizmu oksidovanih HDL i LDL čestica.

Aktivnost PON1 je podložna delovanju različitih delovanja faktora sredine, kao što su ishrana, fizička aktivnost, pušenje, lekovi (Ferre N, 2003). Interesantna je činjenica da se aktivnost PON1 kod QQ fenotipa povećava, a kod RR fenotipova smanjuje sa uključivanjem redovne FA, što se objašnjava različitom otpornošću na dejstvo slobodnih radikala (Otocka-Kmiecik i Orłowska-Majdak, 2009).

S obzirom na ulogu slobodnih radikala u patološkim stanjima, kao što su kardiovaskularne, inflamatorne, neurodegenerativne i maligne bolesti, poslednjih godina je veliko naučno interesovanje usmereno na uticaj intenzivne FA na nivo oksidativnog stresa. Smatra se da mitohondrije predstavljaju glavni izvor produkcije slobodnih radikala u organizmu (Peternej i Coombes, 2011). U nastavku je dat kratak pregled procesa produkcije slobodnih radikala tokom FA.

U respiratornom lancu mitohondrija se oko 99% kiseonika konvertuje u vodu u prisustvu koenzima Q. Međutim, smatra se da se samo 0,15% ukupno udahnutog kiseonika metaboliše do superoksidnog jona (Brand i sar, 2004), iako se ranije smatralo da je taj procenat mnogo veći (1-5%). Ipak, ovaj proces se intenzivira tokom FA, s obzirom da generisanje slobodnih radikala zavisi od maksimalne potrošnje kiseonika, koja se u toku FA povećava 100-200 puta (Deaton CM, 2003).

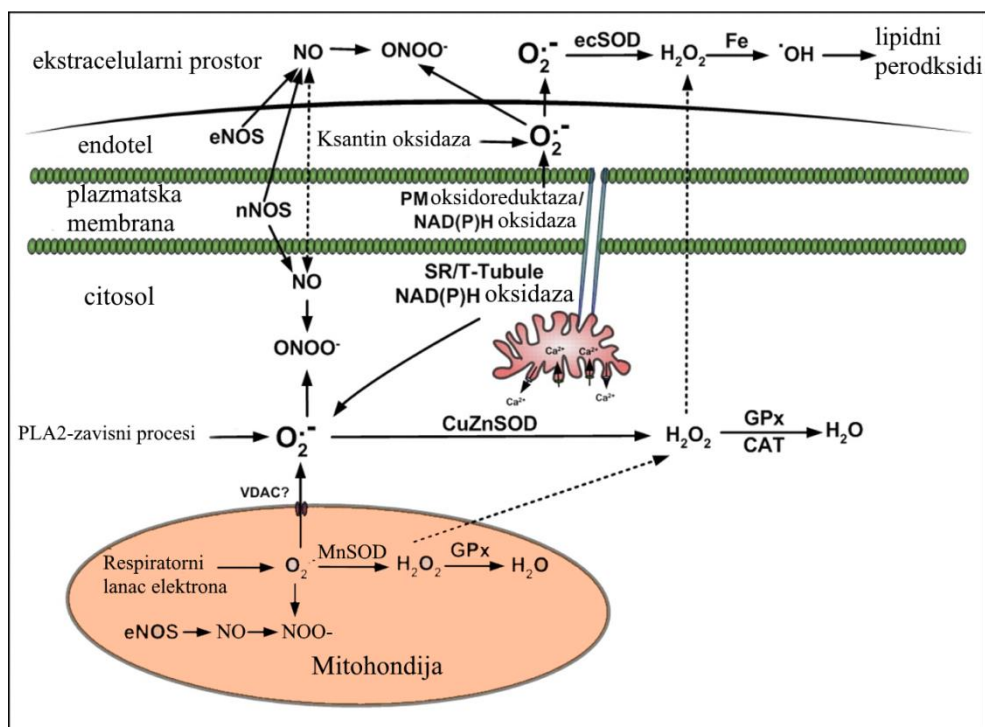
Međutim, tokom FA glavni izvor superoksidnog radikala predstavlja skeletni mišić, usled aktivacije enzima: ksantin dehidrogenaza (XDH), nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

(NADPH) oksidaza, NOS, fosfolipaza A2 (PLA2), kao i usled autoksidacije kateholamina i oksihemoglobina do methemoglobina (Slika 9) (Peternelj i Coombes, 2011). Nakon primarnog povećanja produkcije ROS, dolazi i do sekundarnog formiranja prooksidanasa, usled destrukcije proteina koji sadrže gvožđe, aktivacije fagocita (makrofaga i neutrofila) i gubitka homeostaze kalcijuma. Generisanje slobodnih radikala zavisi od intenziteta, dužine trajanja FA, ali i od vrste treninga (aerobni ili anaerobni). Različiti tipovi FA se razlikuju po nivou potrošnje kiseonika, energetskim potrebama, ali i nivou mehaničkog oštećenja tkiva tokom treninga (Fisher-Wellman K, 2009).

XDH katalizuje terminalnu fazu degradacije purinskih baza, tj. konverziju hipoksantina u ksantnin, a zatim u mokraćnu kiselinu, u prisustvu NAD⁺ kao akceptora elektrona. Naime, tokom intenzivne FA, usled povećanih potreba mišića za kiseonikom, mišićna vlakna mogu dospeti u stanje hipoksije, što vodi ka ishemiji. U ovim uslovima, adenzin-tri-fosfat (ATP) se konvertuje u ksantin anaerobnim metabolizmom, dok se XDH proteolitičkom degradacijom transformiše u ksantin oksidazu (XO). Nakon uspostavljanja reperfuzije, povećava se i dotok kiseonika, a XO nastavlja da konvertuje purinske baze u mokraćnu kiselinu, koristeći kiseonik kao akceptor elektrona. Prilikom ovog procesa nastaje i superoksidni anjon. Bitno je napomenuti da je uloga XO u generisanju ROS u humanoju populaciji diskutabilna, usled male količine XDH odnosno XO u organizmu (Deaton CM, 2003).

NADPH oksidaza učestvuje u formiranju superoksidnog anjona transferom elektrona sa NADPH na molekularni kiseonik (Powers SK, 2011). Postoje dve forme ovog enzima: fagocitna, koja se nalazi u aktiviranim makrofagama i neutrofilima i nefagocitna, koja je lokalizovana u sarkoplazmatskom retikulumu, sarkolemi i u transverznim tubulama (T tubule). Obe forme doprinose produkciji slobodnih radikala tokom FA (Powers SK, 2011). Zajedničkom aktivnošću NADPH oksidaze i mijeloperksidaze u fagocitima generišu se superoksidni anjon i hipohlorna kiselina, koja je jedan od najjačih fizioloških oksidanasa. Fiziološka uloga produkcije slobodnih radikala koji nastaju aktivacijom ovih enzima je odbrana od patogena (Droge W, 2002). Međutim, aktivacija fagocita i formiranje slobodnih radikala dejstvom NADPH oksidaze tokom intenzivne FA rezultuje mehaničkim oštećenjem mišića (Deaton CM, 2003).

PLA2 katalizuje hidrolizu fosfolipida ćelijskih membrana i dovodi do oslobađanja arahidonske kiseline. Dalje metabolisanje arahidonske kiseline, koje podrazumeva delovanje lipooksigenaza i cikloooksigenaza dovodi do formiranja prostanoida, ali i superoksidnog anjona.



Slika 9. Prikaz generisanja slobodnih radikala u miocitima tokom FA (Preuzeto iz Powers SK i sar, 2011)

Mora se naglasiti da postoji razlika u fiziološkom odgovoru organizma na kratkotrajnu i dugotrajnu FA. Redovna FA donosi brojne zdravstvene benefite, koji su uzrokovani adaptacijom organizma na visoke nivoe slobodnih radikala, što je pri akutnoj FA zanemarljivo. Konstantna povećana produkcija ROS kod sportista ne mora da uzrokuje dugotrajne negativne posledice na fiziološke funkcije, već naprotiv, dovodi do adaptacije antioksidativnih mehanizama zaštite (Peternej i Coombes, 2011), što za cilj nema potpunu eliminaciju slobodnih radikala iz sistema, već smanjenje potencijalnih oksidativnih oštećenja u toku treninga u budućnosti. Ovaj proces uključuje sledeće mehanizme: ushodnu regulaciju ekspresije i povećanje aktivnosti antioksidativnih enzima, stimulaciju prometa proteina, povećanu efikasnost reparacije DNK i biosintezu mitohondrija i *heat-shock* proteina (Peternej i Coombes, 2011). Pored toga, adaptacija organizma na povećanu količinu ROS pozivno utiče i na remodelovanje skeletnih mišića nakon povreda, smanjenjem inflamacije i apoptoze ćelija (Ji, 2008). Stoga, umerena količina ROS predstavlja neophodan stimulus za pokretanje esencijalnih fizioloških procesa, dok njihova prekomerna produkcija uzrokuje oksidativno oštećenje. Ovo se opisuje procesom

hormeze, odnosno dozno-zavisnim odgovorom, u kome niska doza supstance (ROS) deluje stimulatorno (na antioksidativne mehanizme zaštite), dok visoka doza deluje inhibitorno ili toksično (Mattson, 2008). Ova zavisnost ima oblik zvona. Adaptivni odgovor mitohondrija na povišenu produkciju slobodnih radikala se naziva mitohondrijalna hormeza ili mitohormeza (Ristow i Zarse, 2010) i smatra se ona upravo leži u osnovi mehanizma kojim redovna FA doprinosi promociji zdravlja i prevenciji određenih bolesti (Mattson, 2008). Stoga se opravdanost suplementacije antioksidansima, koja je inače veoma popularna u populaciji sportista, dovodi u pitanje. Smatra se da suplementacija visokim dozama antioksidanasa suprimira adaptivni odgovor organizma na slobodne radikale, a samim tim i antioksidativnu zaštitu (Peternelj i Coombes, 2011).

1.2 GI mikrobiota čoveka i probiotici

1.2.1 GI mikrobiota čoveka

Gastrointestinalna (GI) mikrobiota čoveka predstavlja veoma kompleksan sistem i sastoji se najvećim delom od bakterijske zajednice, koja broji najmanje 500-1000 vrsta, sa oko 10^{14} bakterijskih ćelija (*Human microbiome project*, 2012). Simbiotička zajednica komensalnih bakterija i domaćina zasnovana je na mutualističkim efektima: domaćin pruža komensalnim bakterijama stanište i hranljive materije, dok one sa druge strane učestvuju u imunološkim i metaboličkim funkcijama domaćina. Međutim, pored bakterija, u GI mikrobioti su prisutni i virusi, gljivice, kvasci i protozoe (Sekirov i sar, 2010). Činjenica koja doprinosi slikovitoj ilustraciji veličine ovog ekosistema je da je genom GI mikrobiote oko 150 puta veći od genoma domaćina (*Human microbiome project*, 2012). Dominantni bakterijski tipovi u mikrobioti čoveka su *Firmicutes* i *Bacteroidetes*; tip *Firmicutes* čine Gram+ bakterije koje većinom pripadaju klasi *Clostridia*, međutim obuhvataju i familije *Enterococcaceae* i *Lactobacillaceae* i vrste *Lactococcus* spp. (Ley i sar, 2008, Eckburg i sar, 2005). Tipu *Bacteroidetes* pripadaju Gram-bakterije, a čini ih nekoliko *Bacteroides* vrsta (Eckburg i sar, 2005).

GI mikrobiota predstavlja dinamički ekosistem, koji se konstantno menja pod dejstvom brojnih faktora, kao što su: faktori sredine (način ishrane, primena antibiotika), faktori domaćina (pH vrednost sredine, prisustvo žučnih soli i digestivnih enzima, mukus, vreme tranzita hrane) i faktori koji potiču od samih bakterija (sposobnost adhezije za mukoza epitela, produkcija enzima

i bakteriocina, metabolički kapacitet) (Prakash i sar, 2011). Zanimljiva činjenica je da je najbitniji faktor za oblikovanje mikrobiote čoveka u pogledu broja i vrsta bakterija, faktor ishrane, i to količina i vrsta unetih nedigestibilnih ugljenih hidrata (Sekurov i sar, 2010). Naime, smatra se se da određeni nedigestibilni ugljeni hidrati stimulišu rast određenih vrsta mikroorganizama koji imaju visok afinitet i sposobnost degradacije tog susprata (Flint, 2012). Pored toga, hrana bogata mastima dovodi do smanjenja broja bifidobakterija, koje imaju esencijalnu ulogu u održavanju GIT barijere i stimulacije rasta bakterija koje proizvode endotoksine (Cani i sar, 2007). U kontekstu hrane bogate mastima, često se pominje gojaznost, koja je takođe povezana sa narušavanjem GI mikrobiote. Međutim, neke studije ukazuju na to da se izmene u mikrobioti odvijaju nezavisno od prisustva gojaznosti (Hildebrandt i sar, 2009).

Sastav mikrobiote se menja duž GIT-a: u tankom crevu dominantne su vrste *Proteobacteria* i predstavnici familije *Lactobacillales*, dok se u debelom crevu nalaze uglavnom predstavnici rodova *Bacteroides* i *Clostridia* (Kamada i sar, 2013). Primećena su dva gradijenta raspodele bakterija u GIT-u: prvi, „vertikalni“, podrazumeva rast bakterijske gustine i raznovrsnosti, i to počev od želuca i duodenuma, gde je prisutno oko $10^1 - 10^3$ bakterija/g sadržaja, zatim raste do $10^4 - 10^7$ bakterija/g sadržaja u jejunumu i ileumu, postižući svoj maksimum od $10^{11}-10^{12}$ bakterija/g sadržaja u kolonu (Sekirov i sar, 2010). Drugi gradijent raspodele bakterija je „horizontalan“ i podrazumeva rast broja bakterija duž veze tkivo-lumen: mali broj dobro prilagođenih vrsta bakterija se nalazi u mukusu, dok je veliki broj bakterija prisutan u lumenu (Sekirov i sar, 2010).

Najvažnije uloge GI mikrobiote su:

- omogućavanje biohemijskih puteva za digestiju dijetarnih polisaharida koji se ne podležu dejstvu enzima domaćina;
- održanje GI funkcije i strukture;
- protektivna – imunološka: zaštita domaćina od patogenih bakterija i inflamatornih stanja;
- metabolička – sinteza vitamina K i većine vitamina B kompleksa, aminokiselina i biotransformaciju žučnih kiselina (LeBlanc i sar, 2013).

S obzirom da čovek ne poseduje enzime za razgradnju određenih polisaharida, prisustvo GI mikrobiote omogućava domaćinu da iskoristi energiju iz određene hrane. Naime, GI mikrobiota poseduje širi spektar saharolitičkih enzima, koji digestuju dijetarne polisaharide, a koji inače ne podležu dejstvu enzima domaćina. Animalne studije su pokazale da aksenične

životinje (životinje koje rastu u sterilnim uslovima, te poseduju sterilni GIT) zahtevaju 30% više energetskog unosa za održavanje telesne mase u poređenju sa životinjama koje poseduju GI mikrobiotu (Wostmann i sar, 1983). Fermentacija polisaharida se odigrava u kolonu i cekumu. Međutim, krajnji produkti ovog procesa, kratkolančane masne kiseline (eng. *Short Chain Fatty Acids*, SCFA), od kojih su najvažnije acetati, butirati i propionati, zapravo predstavljaju najveći benefit fermentacije nedigestibilnih polisaharida (Wong i sar, 2006). Pored stimulacije apsorpcije soli i vode, SCFA pokazuju i trofični efekat na rast intestinalnog epitela (Wong i sar, 2006). U tom smislu se posebna pažnja daje butiratu, koji se smatra ključnim izvorom energije za epitelne ćelije (Bergman, 1990). Butirat indukuje sekreciju mucina i antimikrobnih peptida i na taj način pojačava odbrambenu barijeru kolona (Hamer i sar, 2008). U kontekstu inhibicije ćelijskog ciklusa i promovisanja apoptoze izmenjenih kolonocita, butirat igra esencijalnu ulogu u prevenciji kancera kolona (Yu i sar, 2012). Butirat takođe poseduje i imunološku, tj. antiinflamatornu ulogu, suprimirajući aktivaciju NF- κ B, transkriptora gena koji kodira sintezu proinflamatornih citokina (Luhrs i sar, 2002).

Bitna stavka širokog spektra dejstava GI mikrobiote je i strukturalni i morfološki razvoj GIT-a. Animalne studije su pokazale da aksenični miševi poseduju manji broj epitelnih peharastih ćelija i tanji mukusni sloj u odnosu na konvencionalne miševе (Kandori i sar, 1996). Nakon transplatacije mikrobiote konvencionalnog miša, strukturne anomalije su nestale (Enss i sar, 1992).

Na lokalnom nivou, GI mikrobiota poseduje važnu protektivnu ulogu, s obzirom na to da inhibira kolonizaciju patogena. Nekoliko mehanizama je uključeno u ovaj proces: kompeticija za vezivna mesta epitela GIT i nutrijente, smanjenje pH sredine produkcijom organskih kiselina i sekrecija antimikrobnih agenasa – bakteriocina (Prakash i sar, 2011). Međutim, GI mikrobiota predstavlja esencijalni faktor za pravilan razvoj i regulaciju kako lokalnog, tako i sistemskog imuniteta: sekrecija sIgA, sazrevanje B ćelija i T ćelijskih populacija (Th1, Th2, Treg i Th17 limfocita) (Turroni i sar, 2014). Pored toga, animalne studije su pokazale da aksenični miševi poseduju anomalije imunskog sistema u vidu slabije razvijenih Pejerovih ploča i izolovanih limfoidnih folikula (Cebra i sar, 1998).

Disbioza predstavlja promenu u sastavu GI mikrobiote, tj. njenoj metaboličkoj aktivnosti i distribuciji bakterija. Ipak, priroda povezanosti bolesti i disbioze nije još uvek detaljno istražena, ali sve je više dokaza da nedostatak određenih komensalnih bakterija u GI mikrobioti

ima ulogu u razvoju rizika određenih poremećaja, kao što su gojaznost i inflamatorna bolest creva (Salzman i Bevins, 2013; Hill i sar, 2014). Stoga, ne iznenađuje veliko interesovanje za izmenu sastava GI mikrobiote i zaista, brojne studije ukazuju da suplementacija određenim sojem ili definisanom kombinacijom sojeva može nadomestiti nedostajuće komensalne bakterije koje su esencijalne za održavanje ravnoteže u mikrobioti.

1.2.2 Uticaj fizičke aktivnosti na sastav mikrobiote

Postoji mali broj humanih studija koje su se bavile efektima FA na sastav mikrobiote, većina dostupnih podataka dobijena je iz animalnih studija. Naime, raste broj dokaza da FA utiče na sastav mikrobiote. Nakon analize 1493 uzorka fecesa ispitanika koji su učestvovali u projektu “*American Gut Project*”, zaključeno je da FA povećava diverzitet mikrobiote, posebno određenih predstavnika tipova *Firmicutes* i *Clostridiales*, kao što su *Faecalibacterium prausnitzii*, neokarakterisane vrste iz rodova *Oscillospira*, *Lachnospira*, *Coprococcus*, kao i neokarakterisane familije iz tipa *Clostridiales*. Od posebnog značaja je saznanje da FA doprinosi povećanju zastupljenosti *Faecalibacterium prausnitzii* u sastavu mikrobiote, s obzirom na protektivna svojstva ove bakterije u vidu fermentacije vlakana i produkcije butirata i ostalih SCFA. Slični rezultati su dobijeni i u humanoj opservacionoj studiji, gde je analiza uzoraka fecesa pokazala veći divezitet mikrobiote profesionalnih ragbista u odnosu na sedentarne individualce (Clarke i sar, 2014). Pored toga, rod *Akkermansiae*, koji se povezuje sa zdravim metaboličkim profilom, bio je prisutan u većoj meri kod ragbista u odnosu na kontrolu sa visokim indeksom telesne mase (ITM) (Clarke i sar, 2014).

Uvođenje FA kod miševa povećalo je broj bakterija tipa *Bacteroidetes*, a smanjilo zastupljenost bakterija tipa *Firmicutes* u GI mikrobioti (Evans i sar, 2014). Pored toga, umerena FA kod miševa hranjenih masnom hranom sprečila je uvećanje telesne mase, a uočeno je i povećanje diverziteta GI mikrobiote, uvećanjem broja *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* i *Blautia coccooides–Eubacterium* rectale, a smanjenjem broja predstavnika iz rodova *Clostridium* i *Enterococcus* u GI mikrobioti u odnosu na kontrolne sedentarne miševе (Queipo-Ortuno i sar, 2013). Slično tome, 6 nedelja FA u mišjem modelu dijabetesa rezultovalo je uvećanjem zastupljenosti određenih vrsta iz tipa *Firmicutes* i smanjenjem rodova *Bacteroides/Prevotella* u poređenju sa kontrolnim sedentarnim miševima (Lambert i sar, 2015).

Zanimljivi su rezultati studije koja se bavila efektima FA u modelima hipertenzivnih, gojaznih i negojaznih miševa (Petritz i sar, 2014). Najpre je otkrivena sličnost u sastavu GI mikrobiote između negojaznih i hipertenzivnih miševa, a zatim i njihova razlika sa gojaznim miševima. Uvođenje FA doprinelo je povećanju zastupljenosti roda *Lactobacillus*, a smanjenju rodova *Streptococcus*, *Aggregatibacter* i *Sutterella*. Peroralno eksponiranje polihlorovanim bifenilima značajno je izmenilo GI mikrobiota miševa, uglavnom redukujući količinu *proteobacteria*, dok je FA delimično smanjila ove efekte (Choi i sar, 2013).

Publikovana je samo jedna studija koja se bavila efektima GI mikrobiote na sportske performanse (Hsu i sar, 2015). Naime, autori su pratili vreme plivanja akseničnih miševa (AM), zatim miševa čija GI mikrobiota nije sadržala specifične patogene (BP), kao i miševa čija je mikrobiota bila sastavljena samo od soja *Bacteroides fragilis* (BF). Uočeno je da su aktivnosti glutation peroksidaze i katalaze više u BP grupi u odnosu na AM grupu, dok je aktivnost superoksid dismutaze bila niža u BF grupi u odnosu na BP i AM grupu. Vreme plivanja miševa bilo je duže za BP i BF grupu u odnosu na AM grupu. Ovi zanimljivi rezultati ukazuju da sastav mikrobiote može uticati na sportske performanse, ali i na mehanizme antioksidativne zaštite. Ove efekte bi svakako trebalo ispitati u budućim humanim studijama.

Mora se napomenuti da su se opisane studije koncentrisale uglavnom na određene rodove bakterija i da nisu uzimale u obzir uticaj FA na viralne i gljivične komponente GI mikrobiote. Ipak, s obzirom na značaj GI mikrobiote u regulaciji energetskog metabolizma, oksidativnog stresa, inflamatornih i imunoloških procesa, razumno je očekivati i njen uticaj na sportske performanse. Literaturni podaci na ovu temu su još uvek vrlo oksudni, te je neophodno produbiti znanja o ovoj oblasti sprovođenjem pre svega humanih interventnih studija.

1.2.3 Probiotici

Ideju probiotika začeo je *Metchnikoff* 1908. god., kada je predočio značaj laktobacila u smislu održanja zdravlja i dostizanja dugovečnosti. Prema definiciji Svetske Zdravstvene Organizacije (SZO), probiotici predstavljaju žive mikroorganizme, koji primenjeni u adekvatnoj količini, ispoljavaju povoljne efekte na zdravlje domaćina (Hotel, 2001). Međutim, i mrtve bakterije i molekulske komponente bakterija takođe mogu da ispolje određene probiotske efekte (Giahi i sar, 2012), iako se u funkcionalnom smislu ne smatraju probioticima. Pod pojmom probiotskih bakterija uglavnom se podrazumevaju bakterije mlečne kiseline (BMK), koje se

tradicionalno upotrebljavaju u proizvodnji fermentisanih mlečnih proizvoda. Međutim, širom sveta se tradicionalno upotrebljavaju različiti fermentisani proizvodi, koji sadrže i druge rodove i vrste. Na primer, vrste roda *Bacillus* su prisutne u fermentisanim proizvodima čiji su izvor mahunarke (Kubo i sar., 2011). Vrste rodova *Bifidobacterium*, *Brachybacterium*, *Brevibacterium* i *Propionibacterium* su izolovane iz sireva, a vrste rodova *Arthrobacter* i *Hafnia* iz fermentisanih mesnih produkata (Bourdichon i sar., 2012).

BMK vrše fermentaciju šećera do mlečne kiseline, po čemu su i dobile ime. Veliki broj naučnih istraživanja koja se poslednjih godina bave ovom tematikom doprineo je otkrivanju širokog dijapazona povoljnih efekata BMK na zdravlje, što je i uticalo na to da ove bakterije postanu najčešće korišćeni probiotski mikroorganizmi (Soccol i sar, 2010). U smislu upotrebe BMK kao startera kulture, ovi proizvodi svrstavaju se u kategoriju funkcionalne hrane (Saarela i sar, 2000). Smatra se da fermentisani mlečni proizvodi čine skoro trećinu ishrane ljudi, te predstavljaju glavni izvor ovih bakterija u humanoj ishrani (Derrien i van Hylckama Vlieg, 2015). BMK spadaju i u komensale, čineći sastavni deo mikrobiote na mukoznim membranama usta, kože, GIT-a i genitourinarnog trakta (Fijan i sar, 2014). Klasifikuju se kao Gram+ bakterije, koje rastu u mikroaerofilnim ili strogo anareobnim uslovima (Fijan i sar, 2014). Ovoj grupi bakterija pripada širok spektar rodova sa velikim brojem vrsta, a najznačajnije su: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* i *Weissella* (Klein i sar, 1998). Rod *Lactobacillus* pripada domenu *Bacteria*, tipu *Firmicutes*, klasi *Bacilli*, redu *Lactobacillales*, familiji *Lactobacillaceae* (Felis i Dellaglio, 2007). U okviru ovog roda identifikovan je veliki broj vrsta i sojeva, koji se međusobno razlikuju po karakteristikama, kako strukturalnim, tako i metaboličkim. Među *Lactobacillus* vrstama se razlikuju vrste koje čine deo stalne GI mikrobiote, kao što su *L. gasseri* i *L. reuteri* i vrste koje predstavljaju tranzitnu mikrobiotu, kao što su *L. paracasei*, *L. rhamnosus* i *L. plantarum* (Derrien i van Hylckama Vlieg, 2015).

Probiotske bakterije spadaju u grupu tzv. tranzitnih bakterija GIT, s obzirom da ne mogu da ga trajno kolonizuju, već imaju sposobnost da modifikuju mikrobiotu jedino u periodu dok traje njihova suplementacija (Ivanov i Honda, 2012). Sojevi koji se najčešće mogu naći u komercijalnim proizvodima pripadaju članovima iz rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. U Tabeli 1 prikazani su najčešće korišćeni sojevi u komercijalne svrhe.

Tabela 1. Najčešće korišćeni probiotski sojevi u komercijalnim proizvodima

<i>Lactobacillus</i> vrste	<i>Bifidobacterium</i> vrste	Ostale bakterije
<i>L. rhamnosus</i> GG (LGG)	<i>B. bifidum</i> Malyoth	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>L. acidophilus</i> DDS1	<i>B. longum</i> bb536	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>L. acidophilus</i> NAS	<i>B. breve</i>	
<i>L. helveticus</i> L10 (Lafti L10)	<i>B. animalis</i> subsp. <i>infantis</i>	
<i>L. bulgaricus</i> LB-51	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	
<i>L. gasseri</i> BNR17	<i>B. lactis</i> BB12	
<i>L. plantarum</i> 299v		
<i>L. salivarius</i>		
<i>L. fermentum</i>		
<i>L. reuteri</i>		

Bakterijski soj mora da ispuni niz strogih kriterijuma, kako bi se okarakterisao kao probiotski: u Tabeli 2 dat je prikaz kriterijuma za selekciju probiotskih mikroorganizama (Vasiljevic i Shah, 2008). Svakako jedan od najvažnijih kriterijuma za selekciju probiotika predstavlja bezbednost primene. Generalno, probiotici su označeni kao bezbedni za upotrebu, tj. dodeljen im je GRAS status (eng. *Generally Regarded As Safe*). Evropska Agencija za bezbednost hrane (eng. *European Agency of Food Safety, EFSA*) je na osnovu procene rizika najčešće korišćenih probiotskih sojeva dala smernice za bezbedni odabir probiotskih mikroorganizama pri proizvodnji hrane i dijeteskih suplemenata, u vidu liste pod nazivom „Kvalifikovana Pretpostavka Bezbednosti“ (eng. *Qualified Presumption Safety, QPS*). Ipak, neželjeni efekti upotrebe probiotika su retki, a poseban oprez se savetuje u slučaju imunokompromitovanih osoba, jer su ovoj populaciji zabeleženi slučajevi infekcija i sepe (Panel, 2013). Uobičajena neželjena dejstva traju nekoliko dana od početka suplementacije i uključuju flatulenciju, abdominalni bol, promene u peristaltici creva, „krčanje creva“. Međutim, bitan aspekt bezbednosti mikroorganizama kao probiotika je prisustvo gena za rezistenciju na antibiotike, koji se mogu prenositi na druge mikroorganizme (Vasiljevic i Shah, 2008). Stoga se konstantno vrše *in vitro* testiranja u svrhu provere odsustva rezistencije na antibiotike. Određena istraživanja su pokazala da rizik za prenos gena rezistancije zavisi od prirode genetičkog

materijala (plazmidi, transposoni), kao i prirode i koncentracije sojeva donora i akceptora gena, kao i njihove interakcije sa spoljašnjom sredinom (Marteau, 2001).

Mehanizmi delovanja probiotskih mikroorganizama su usko povezani sa primenjenom dozom i sojem. Zanimljiva činjenica je da su i efekti određenog probiotskog mikroorganizma ne samo specifični za bakterijsku vrstu, već i za različite sojeve u okviru iste vrste. Naime, specifičnost probiotskog soja se ogleda u specifičnom vezivanju za epitel GIT-a, ali i u prirodi interakcije sa imunskim sistemom domaćina (Dong i sar, 2012). Primenjena doza mikroorganizama je takođe od esencijalne važnosti za ispoljavanje probiotskog dejstva. Da bi se ostvarili povoljni efekti, potrebno ih je konzumirati u adekvatnoj količini, što generalno predstavlja raspon od 10^8 do 10^{11} CFU (*Collony Forming Units*) dnevno (West i sar, 2009). Međutim, količina probiotskih mikroorganizama koja je potrebna za ostvarivanje probiotskog dejstva je individualna za svaki soj i treba da se zasniva na onim količinama koje su prethodno pokazale efikasnost u kontrolisanim studijama. Pored toga, pokazano je da čak i različite doze jednog istog soja mogu pokazati različite imunološke efekte: humana studija izvedena u populaciji starijih ljudi je pokazala da suplementacija sa *L. plantarum* CECT7315/7316 u dnevnoj dozi od 5×10^8 CFU uzrokuje porast Treg ćelija, dok 10 puta veća dnevna doza od 5×10^9 CFU dovodi do rasta udela populacija citotoksičnih CD8+CD25+, CD56+CD16+ ćelija (Mane i sar, 2011).

Do sada je sproveden značajan broj istraživanja o efektima primene BMK u različitim patološkim stanjima i oboljenjima. Treba prvenstveno istaći ona, gde su efekti probiotika dokazani: dijareja virusnog porekla, putnička dijareja, dijareja uzrokovana antibioticima, rekurentne infekcije uzrokovane bakterijom *C. difficile*. Pored toga, postoje poremećaji i oboljenja u kojima probiotici pokazuju pozitivne efekte, ali još uvek ne postoji dovoljno dokaza o njihovoj efektivnosti u prevenciji, tako i u tretmanu ovih stanja: alergije na hranu, ulcerozni kolitis, respiratorne infekcije, intolerancija na laktozu, ekcem. Na kraju, treba pomenuti i stanja čiji se uzroci, kao i tok i razvoj bolesti povezuju sa promenom mikrobiote, dok efekti suplementacije probioticima u ovim stanjima zahtevaju dodatna istraživanja: alergijski rinitis, astma, paučitis, genitourinarne infekcije, reumatoidni artritis, poremećaj lipidnog statusa, dijabetes melitus, nealkoholna masna jetra, prekomerna telesna težina, anksioznost itd. Repertoar potencijalno pozitivnih dejstva probiotskih mikroorganizama je prikazan i ukratko opisan u Tabeli 3 (Holzapfel i sar, 2001, Guo i sar, 2011, Mishra i sar, 2015).

Tabela 2. Kriterijumi za selekciju probiotika za komercijalnu primenu

Generalni zahtevi	Karakteristike
Bezbednosni kriterijumi	Poreklo Patogenost i infektivnost vrste/soja Faktori virulencije – toksičnost, metabolička aktivnost, intrinzička svojstva, npr. rezistencija na antibiotike
Tehnološki kriterijumi	Genetički stabilni sojevi Održanje vijabilnosti tokom tehnoloških procesa i skladištenja Dobre senzorne karakteristike Rezistencija na bakteriofage Mogućnost industrijske proizvodnje velikih razmera
Funkcionalni kriterijumi	Tolerancija na želudačne sokove Tolerancija na žučne soli Sposobnost adhezije na mukoznu površinu Validirani i dokumentovani zdravstveni efekti
Poželjni fiziološki kriterijumi	Imunomodulacija Antagonistička aktivnost u odnosu na GI patogene Aktivnost u metabolizmu holesterola Aktivnost u metabolizmu laktoze (prisustvo enzima laktaze) Antimutagena i antikancerogena svojstva

Tabela 3. Pozitivni efekti probiotskih sojeva na zdravlje i mehanizmi delovanja

Pozitivni efekti probiotika na zdravlje	Predloženi mehanizam postizanja efekta
Antimikrobni potencijal, tretman i prevencija GI, respiratornih i urogenitalnih infekcija	Produkcija antimikrobnih supstanci, bakteriocina, imunomodulacija
Antioksidativni efekat	Ushodna regulacija aktivnosti antioksidativnih enzima: GPX, SOD, i CAT; produkcija peptida koji poseduju antioksidantni potencijal, modifikacija GI mikrobiote
Kontrola i ublažavanje inflamatornih i atopijskih oboljenja (npr. ulcerozni kolitis, atopijski dermatitis)	Modulacija GI mikrobiote, modulacija imunskog odgovora
Antihipertenzivno dejstvo	Produkcija peptida koji poseduju antihipertenzivni efekat, dejstvo na Na-K pumpu
Hipoholesterolemijski efekat	Dekonjugacija žučnih kiselina aktivnošću hidrolaza koje sintetišu bakterije; konverzija holesterola u koprostanol; vezivanje holesterola i MK za bakterijski zid, redukcija hepatične sinteze holesterola; redistribucija holesterola iz plazme u jetru preko produkcije SCFA
Ublažavanje simptoma intolerancije na laktozu	Efekat bakterijske β -galaktozidaze na laktozu
Antikancerogena i antimutagena aktivnost	Inhibicija konverzije pro-kancerogena u aktivne kancerogene, vezivanje i inaktivacija mutagenih jedinjenja, supresija rasta bakterija sa pro-kancerogenom aktivnošću, imunomodulacija, redukcija apsorpcije karcenogena

1.2.4 Interakcije probiotskih bakterija i imunskog sistema

Jedan od pretpostavljenih mehanizama delovanja probiotskih mikroorganizama je i modulacija imunskog sistema. Ipak, rezultati meta-analiza i studija koje su se bavili proučavanjem ovog efekta, pokazali su određenu nekonzistentnost, s obzirom na specifičnost delovanja probiotskog soja, ali i genetski poliformizam domaćina, stil života, epigenetsku varijabilnost itd. I pored velike pažnje naučne javnosti i napretka u otkrivanju prirode interakcija imuniteta sa probiotskim bakterijama, znanja o ovoj oblasti su još uvek ograničena. Dejstvo probiotika najčešće ne podrazumeva jedan konkretni mehanizam, već kombinaciju aktivnosti na više nivoa, koje se generalno mogu podeliti u 3 grupe (Leroy i sar, 2008):

1. Lokalna interakcija sa mikroorganizmima u GIT-u;
2. Ojačanje intestinalne mukozne barijere;
3. Uticaj na sistemski imunitet.

Modulacija mukoznog imuniteta

Već je rečeno da mukozna barijera predstavlja prvu liniju odbrane organizma od hemijskih i mikrobioloških agenasa iz sadržaja lumena. Njen integritet je osiguran postojanjem tesnih veza među entrocitima, sekrecijom mukusa, oslobađanjem antimikrobnih peptida iz Panetovih ćelija i sekrecijom sIgA antitela. Neke lokalne aktivnosti probiotika u okviru inhibicije kolonizacije GIT-a patogenima, kao što su kompeticija za nutrijente i mesta adhezije na mukoza GIT-a, produkcija antimikrobnih supstanci i sniženje pH sredine dobro su izučene (Prakash, 2011). Naime, u intestinalnoj tečnosti, postoje 2 grupe AMP: katelicidini, koji se luče konstitutivno u epitelnim ćelijama i defenzini, koji se primarno sekretuju u Panetovim ćelijama (α -defenzin), ali i u epitelnim ćelijama (β -defenzin) (Kemgang i sar, 2014). Čini se da probiotici nemaju efekta na ekspresiju katelicidina, najverovatnije usled njihove konstitutivne produkcije. Naprotiv, in vitro studije su pokazale da probiotska smeša VSL#3 stimuliše sekreciju i ekspresiju β -defenzina na Caco-2 ćelijama (Schlee i sar, 2008). Pored toga, mišji model je pokazao da konzumacija *L. crispatus* K-11 povećava ekspresiju gena odgovornih za sintezu AMP mucina 13 i defenzina- α u Pejerovim pločama čak dva puta u odnosu na kontrolnu grupu, omogućavajući konstantnu zaštitu od patogena, polutanata i toksina (Tobita i sar, 2010).

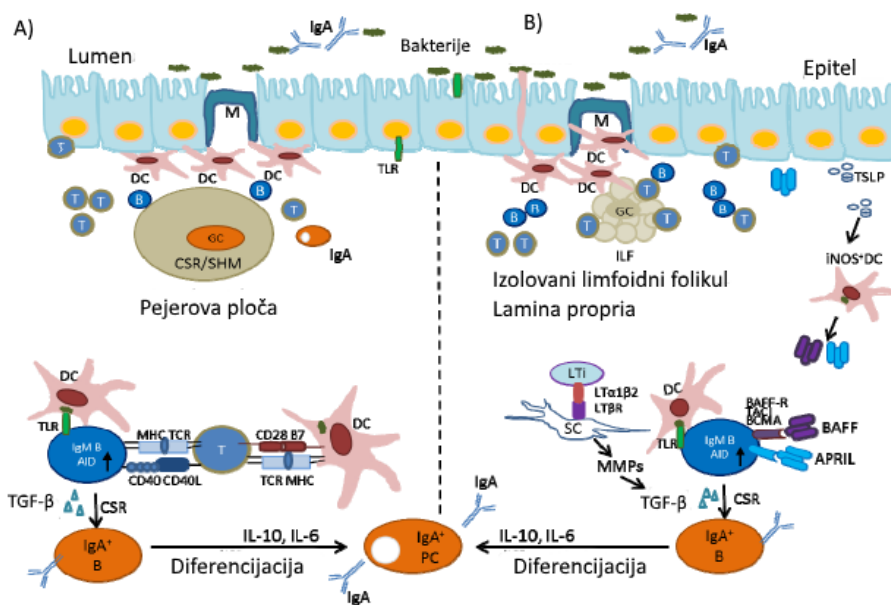
Oštećenje mukozne barijere može da uzrokuje adherenciju bakterija za epitel, a pri značajnijem gubitku mukusa dovodi i do prodora bakterija i antigena u mukozno tkivo (Khan i sar, 1999). U tom smislu su struktura mikrovila i broj peharastih ćelija koje sekretuju mukus od esencijalnog značaja pri sagledavanju zdravstvenog stanja GIT-a. Utvrđeno je da konzumacija *L. casei* DN-114-001 doprinosi održanju broja i strukture mikrovila u mišjem modelu indukovane proteinsko-energetkse malnutricije (Gaeldano i sar, 2011).

Određeni probiotski sojevi imaju sposobnost da ojačaju intestinalnu mukoznu barijeru i posredstvom ojačanja tesnih veza između enterocita. Ovaj efekat je posebno važan za sportiste, s obzirom da je u ovoj populaciji prisutna povećana GI permeabilnost, usled smanjenog krvnog protoka i povišene temperature organizma tokom intenzivne FA (Pyne i sar, 2009). Pozitivni efekti probiotika u smanjenju intestinalne permeabilnosti se pripisuju sledećim mehanizmima: stimulacija sinteze proteina koji učestvuju u izgradnji tesnih veza, održanje aktivnosti jonske pumpe, aktivacija mitogen-aktiviranih protein-kinaza i *heat-shock* proteina-70 (Pyne i sar, 2009). Suplementacija komercijalnim preparatom koji sadrži smešu više bifidobakterija i laktobacila uzrokovao je značajno smanjenje biomarkera intestinalne permeabilnosti zonulina u fecesu u populaciji vrhunskih sportista (Lamprecht i sar, 2012). Međutim, probiotici utiču na intestinalnu permeabilnost i posredstvom produkcije SCFA i redukcije bakterijskih metabolita, kao što su sulfidna kiselina i ekstracelularni superoksid (Iacono i sar, 2011).

U okviru regulisanja mukoznog imuniteta, probiotici moduliraju i sekreciju sIgA u lumen GIT-a, kao i broj IgA+ ćelija. Animalne studije su pokazale da administracija sojeva *L. crispatus* KT-11 (Tobita i sar, 2010) dovodi do dozno-zavisnog porasta koncentracije sIgA antitela u intestinalnoj tečnosti. Slično, 7-dnevna konzumacija *L. casei* CRL 431 povećava broj ćelija koje sekretuju IgA antitela (Maldonado i Perdigon, 2006). Probiotska administracija ne izaziva porast IgA+ ćelija samo u GIT-u, već i u udaljenim mukoznim mestima, kao što su npr. bronhijalne ili mlečne žlezde, i to migracijom u mezenterični limfni čvor (engl. *Mesenteric Lymphatic Node* – MLN), a zatim i torakalnim kanalom u sistemsku cirkulaciju (Gaeldano i sar, 2007, De Moreno de LeBlanc i sar, 2008).

Mehanizam uticaja probiotika na sekreciju i nivo sIgA još uvek dovoljno razjašnjen, ali se smatra da postoje dva mehanizma (Slika 10), od kojih jedan zahteva posredovanje T limfocita, a drugi se odigrava bez njihovog učešća (Liu i Rhoads, 2013). T limfocitima posredovani mehanizam se odvija u germinativnim centrima Pejerovih ploča, Slika 10A. DĆ lamine proprije

uzorkuju bakterije na apikalnoj površini IEC, a zatim nakon ekspimiranja antigenskih peptida na svojoj površini aktiviraju T limfocite. Zatim sledi klasična T-B kooperacija. Citokini koji favorizuju izotipsko prekopčavanje ka IgA antitelima su pre svega TGF- β , ali i IL-10 i IL-6, koje sekretuju DC (Liu i Rhoads, 2013).



Slika 10. Stimulacija sekrecije sIgA antitela: A) T-zavisnim odgovorom B) T nezavisnim odgovorom (preuzeto iz Liu i Rhoads, 2013)

T-nezavisni imunski odgovor (Slika 10B) je ograničen na lamenu propriju i izolovane limfoidne folikule (ILF), koji se odlikuju prisustvom posebnih DC, označene kao Φ -DC (Liu i Rhoads, 2013). Ove ćelije nakon interakcije sa komensalnim bakterijama, imaju sposobnost da direktno vrše prezentaciju antigena B ćelijama. Takođe, proizvode i faktore koji su esencijalni za sekreciju sIgA antitela, kao što su TNF- α i iNOS (Tezuka i sar, 2007), ali i APRIL (engl. *Proliferation- Inducing Ligand*) i BAFF (engl. *B-cell Activating Factor of the TNF Family*). Ovi biomolekuli indukuju izotipsko prekopčavanje za sintezu antitela IgA klase interakcijom sa receptorom za BAFF (BAFF-R) i BCMA (eng. *B-cell maturation antigen*) (He et al, 2007). IgA+ B ćelije generisane unutar ILF zatim podležu diferencijaciji u plazma ćelije. Pored toga, komensalne bakterije mogu da aktiviraju TLR-ove koji su prisutni na površini IEC, što takođe rezultuje sekrecijom BAFF, APRIL, IL-6 (Liu i Rhoads, 2013). Pored toga, IEC sekretuju i TSLP (engl. *Thymic stromal lymphopoietin*), koji pojačava ekspresiju navedenih molekula.

Izolovane plazma ćelije iz mišje lamine proprije su pokazale sposobnost sekrecije TNF- α , iNOS i antimikrobnih medijatora (Fritz i sar, 2012).

Modulacija sistemskog imuniteta

Pored relativno dobro izučenih lokalnih efekata suplementacije probiotika, i dalje najveći izazov predstavlja objašnjenje prirode uticaja probiotika na sistemski imunitet domaćina. Naime, probiotski mikroorganizmi se unose peroralnim putem u organizam i njihov prvi kontakt sa imunskim sistemom predstavlja interakcija sa mukozom GI trakta, koja sadrži čak 70% svih imunskih ćelija organizma (Dwivedi i sar, 2016). Imunski sistem intestinalne mukoze se sastoji od limfoidnog tkiva povezanog sa crevnim traktom (eng. *Gut-Associated Lymphoid Tissue*, GALT), koji istovremeno i predstavlja najveće limfoidno tkivo u organizmu. GALT obuhvata uređena limfoidna tkiva, kao što su MLN, zatim Pejerove ploče i IFL, ali i difuzne imunske strukture, koje su locirane duž lamine proprije i epitela GIT-a (Mowat, 2009). Probiotske bakterije na svom ćelijskom zidu poseduju molekulske obrasce mikroorganizama (engl. *Microorganism-Associated Molecular Patterns*, MAMPs), kao što su: peptidoglikani i lipoproteini (većina bakterija), lipopolisaharidi (Gram- bakterije), tejhojna kiselina (Gram+ bakterije), lipotejhojna kiselina, flagelini i dr. MAMP molekuli se ponašaju kao ligandi za aktivaciju receptora za prepoznavanje obrazaca (eng. *Pattern Recognition Receptors*, PRRs), koji su prisutni na imunskim ćelijama GALT-a i IEĆ, uključujući različite klase TLR (eng. *Toll-like Receptors*, TLRs), CLR (engl. *C-type lectin receptor*), NLR (engl. *Nucleotide oligomerization domain (NOD)-like receptors*) (van Baarlen i sar, 2013). Hemijska struktura MAMP molekula je striktno specifična za određeni probiotski soj, i to u pogledu polimerne strukture, dužine i vrste molekuskog obrasca (van Baarlen i sar, 2013). Pored toga, specifičnost hemijske strukture, ali i primenjena doza, određuju prirodu indukovano imenskog odgovora (van Baarlen i sar, 2013). Npr. promena strukture lipoteihoične kiseline kod nekih laktobacila uzrokuje gubitak proinflamatornih sposobnosti usled nemogućnosti aktivacije TLR-2 (van Baarlen i sar, 2013).

Indukcija imenskog odgovora započinje aktivacijom PRR na EIĆ i imunskim ćelijama GALT-a, što pokreće kaskadu citokina i hemokina i posledično modifikuje mukozni imunski sistem. Međutim, aktivacija TLR na specijalizovanim enteralnim M ćelijama, omogućava i dostupnost antigena DĆ, kojima pripada glavna uloga u posredovanju mikrobiote, urođenog i

stečenog imuniteta. Važnost DC se ogleda u velikoj efikasnosti prezentacije antigena i sposobnosti aktivacije naivnih ćelija (Banchereau i sar, 2000). Pored toga, DC lamine proprije poseduju mogućnost direktnog uzorkovanja komensalnih i enteropatogenih bakterija koje se nalaze u lumenu creva posredstvom transepitelih dendritskih nastavaka, koji ne narušavaju mukozni integritet (Rescigno i sar, 2001). Sistemski imunski odgovor je najčešće iniciran u MLN, dok se lokalni pokreće u MLN i Pejerovim pločama. Iako efikasnost translokacije komensalnih bakterija u MLN zavisi od koncentracije i vrste probiotskog soja, udeo peroralno unetih ćelija mikroorganizama koji se uzorkuje je zapravo vrlo mali (Macpherson i Uhr, 2004), što ukazuje na važnost unete doze probiotika.

Interakcija probiotika i urođenog imunskog sistema

Određeni probiotski sojevi imaju sposobnost da regulišu nekoliko aspekata urođenog imuniteta, protiv intracelularnih i ekstracelularnih patogena. S obzirom na svoj GRAS status, probiotici uglavnom ne izazivaju promenu ukupnog broja leukocita, kao ni leukocitnih populacija neutrofila i monocita (Kemgang i sar, 2014). Međutim, postoje studije koje ukazuju na sposobnost probiotskih sojeva da modifikuju aktivnost i broj NK ćelija. Konzumacija jogurta koji je fortifikovan probiotskim mikroorganizmima *L. gasseri* CECT5714 i *L. coryniformis* CECT5711 rezultovala je značajnim porastom udela populacije NK ćelija (Olivares i sar, 2006). Pored toga, konzumiranje mlečnih proizvoda koji sadrže *B. lactis* HN109 i *L. rhamnosus* HN001 značajno je povećalo NKCC (Sheih i sar, 2001, Gill i sar, 2001). Takođe, suplementacija *L. casei* Shirota prouzrokovala je uvećanje NKCC, što je koreliralo sa porastom sekrecije IL-12, citokina uključenog u aktivnost NK ćelija (Takeda i sar, 2006). Ova činjenica ukazuje na sposobnost određenih probiotskih bakterija da aktiviraju DC, koje sekrecijom IL-12 stimulišu NK ćelije (Rizzello i sar, 2011). Svakako, ovaj efekat je striktno specifičan za soj, s obzirom na veliki broj studija koji nije pokazao pozitivan efekat probiotske suplementacije na broj i aktivnost NK ćelija.

Probiotski mikroorganizmi mogu da indukuju i ostale proinflamatorne citokine. *In vitro* studija koja se bavila proučavanjem imunomodulatornih svojstava 6 probiotskih sojeva (*L. casei* Shirota, *L. rhamnosus* GG, *L. plantarum* NCIMB 8826, *L. reuteri* NCIMB 11951, *B. longum* SP 07/3 i *B. bifidum* MF 20/5) uočila je njihovu sposobnost da nakon inkubacije sa humanim

mononuklearnim ćelijama periferne krvi (eng. *Peripheral Blood Mononuclear Cells*, PBMCs) izazovu porast nivoa proinflamatornih citokina IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , i GMCSF (engl. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) (Dong i sar, 2012). Međutim, probiotici moduliraju i nivo citokina koje sekretuju IEC; ovaj efekat zavisi od primenjenog soja. Naime, nakon inkubacije enterocita sa ćelijama *L. plantarum* 299v indukovana je sekrecija interleukina 8 (IL-8) (McCracken i sar, 2002). Ipak, uzimajući u obzir ulogu IL-8 u patogenezi nekih stanja hronične inflamacije, kao npr. kod cistične fibroze, psorijaze, reumatoidnog artritisa, poželjnije je sniženje ovog medijatora (Baggiolini i Clark-Lewis, 1992). Npr. *Salmonella dublin* *in vitro* stimuliše IEC da sekretuju IL-8, dok je taj efekat inhibiran prisustvom probiotske smeše VSL#3 (Otte i Podolsky, 2004). Inače, IL-8 ima ulogu neutrofilnog hemoatraktanta (Baggiolini i Clark-Lewis, 1992).

Aktivacija peritonealnih makrofaga je jedan od pokazatelja stimulacije sistemske imunske aktivnosti, ali ovaj mehanizam probiotske aktivnosti ostaje nerazjašnjen. Nekoliko grupa autora je ukazalo na porast fagocitne aktivnosti peritonealnih makrofaga nakon 2, 5 ili 8 nedelja (Kapila i sar 2007, 2012; Rajpal i Kansal 2009). Isti efekti su uočeni nakon konzumacije probiotskih Dahi culture: DI (*L. acidophilus*, *L. casei* i *L. lactis ssp. lactis biovar diacetylactis*) i DII (*L. casei* Dahi kultura BD4), sa istovremenim povećanjem lizosomalne aktivnosti (Shalini i sar. 2010). Sa druge strane, neki probiotici moduliraju, tj. "utišavaju" inflamatornu aktivnost makrofaga, inhibirajući aktivaciju NF- κ B i MAPK puta, što ima implikaciju u poremećajima povezanim sa hroničnom inflamacijom (Thomas i Versalovic, 2010, Kemgang i sar, 2014). Npr. *in vivo* studija (Fitzpatric i sar, 2008) je pokazala smanjenu sekreciju inflamatornih medijatora IL-12, IL-6, IL-1 β i IFN γ u mišjem modelu indukovanog kolitisa nakon konzumacije *E. coli* M17.

Interakcije probiotika i stečenog imenskog odgovora

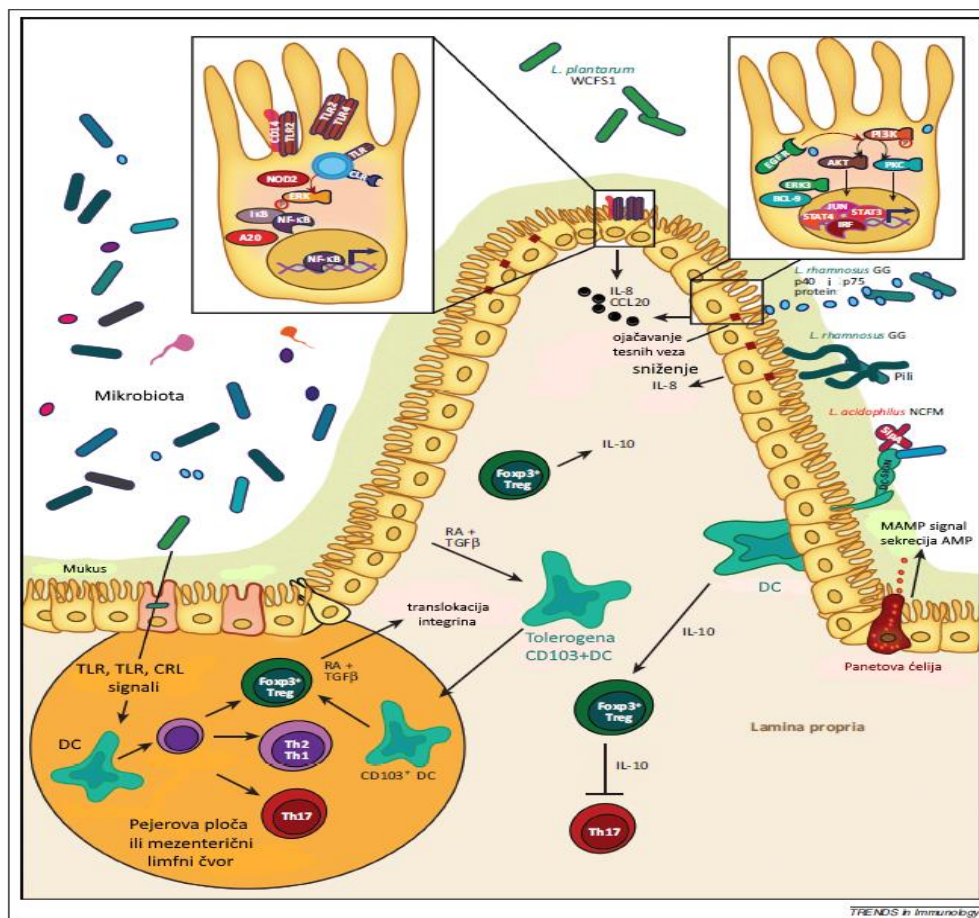
Različiti PRR na površini DC konstantno interaguju sa različitim MAMP molekulskim obrascima. Tokom svoje rane faze, DC poseduju veliki afinitet za preuzimanje antigena. Nakon dobijanja odgovarajućeg antigenskog stimulusa, DC migriraju u sekundarne limfoidne strukture, gde započinje njihov proces maturacije. Ovaj proces podrazumeva eksprimiranje MHC molekula

za prezentaciju antigena, kao i kostimulatora CD40, CD54, CD83, CD80 i CD86 (Borchers i sar, 2009).

U zavisnosti od probiotskog soja, tj. od prirode MAMP obrazaca koji se nalaze na njihovoj površini, pokazano je da različiti mikroorganizmi ispoljavaju veoma različite efekte na aktivaciju DĆ (Christensen i sar, 2002). To zapravo znači da od specifičnosti primenjenog probiotika zapravo zavisi krajnji ishod imunskog odgovora, što se može praktično primeniti u olakšavanju simptoma različitih patogenih stanja. Fenotipsko sazrevanje je praćeno sekrecijom citokina koji oblikuju imunski odgovor i omogućavaju diferencijalnu maturaciju Th1, Th2, Treg ili Th17 ćelija (Thomas i Versalovic, 2010). Naime, citokini su istorijski deljeni u 3 grupe: grupa koja favorizuje Th1 odgovor (TNF- α , IFN- γ , IL-12, IL-2 itd.), grupa koja podstiče Th2 odgovor (IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 itd.) i regulatorni citokini (TGF- β , IL-10) (Abbas i Lichtman, 2006, Delcenserie i sar, 2008). Citokini koje sekretuju Th1 ćelije stimulišu citotoksičnu destrukciju patogena, kao i fagocitozu, dok citokini sintetisani od strane Th2 limfocita favorizuju sekreciju antitela (npr. IgE, IgG4) usmerenih protiv ekstracelularnih patogena i eozinofiliju (Delcenserie i sar, 2008). Različiti mehanizmi uticaja suplementacije probiotskim sojevima prikazani su na Slici 11.

S obzirom na to da je poslednjih decenija uočen istovremeni porast učestalosti alergijskih stanja sa jedne i bolesti uzrokovanih dominacijom Th1 odgovora sa druge strane, zaključuje se da se u rastućem delu opšte populacije ne postiže sazrevanje regulatornih mehanizama koji kontrolišu ravnotežu između dve glavne grane imuniteta. Nedovoljno sazrevanje imunoregulatornih mehanizama se povezuje sa nedostatkom određenih komensalnih bakterija, s obzirom da je mikrobiota njihov najraniji i primarni modulator. Naime, regulatorne T ćelije imaju sposobnost inhibicije imunološkog odgovora i igraju esencijalnu ulogu u indukciji periferne tolerancije na sopstvene i strane antigene (Kemgang i sar, 2014). Postoji 5 vrsta regulatornih T ćelija: CD4+CD25+FoxP3+ prirodne Treg, koje potiču iz timusa (nTreg), CD4+CD25+FoxP3+ indukovane Treg (iTreg), Tr1 (njihova proliferacija je zavisna od prisustva IL-10), Th3 (njihova proliferacija zavisi od prisustva TGF- β 1) i CD8+ Treg (Weiner i sar, 2011). Svakako najinteresantnija je grupa CD4+CD25+FoxP3+; FoxP3 je transkripcioni faktor koji je zadužen za specifične efekte Treg i smatra se njihovim specifičnim markerom (Dwivedi i sar, 2016). Anti-inflamatorni potencijal komensalnih bakterija zasnovan je pre svega na aktivaciji tolerogenih DĆ, koje indukuju proliferaciju Treg. Aktivacija tolerogenih DĆ uključuje

stimulaciju TLR i molekula DC-SING (eng. *dendritic cell (DC)-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin*), koji se nalaze na površini DĆ. Pored toga, pokazano je da određeni sojevi uzrokuju povećanje ekspresije MHC molekula II klase, kao i CD80 i CD40 molekula na površini DĆ. Rezultat ovih procesa je sekrecija citokina, pre svega IL-10 i TGF- β 1, koji indukuju proliferaciju Treg.



Slika 11. Modulacija sistemskog imuniteta (preuzeto iz van Baarlen i sar, 2013)

Regulatorne ćelije inhibiraju Th1, Th2, TH17 i CD8⁺ ćelije posredstvom antigen-nespecifičnih reakcija, kao što su kontakt ćelija-ćelija i sekrecija IL-10, TGF- β 1 i verovatno IL-35 (Dwivedi i sar, 2016). Pojačani Th1 odgovor, tj. citokinski profil kojim se on karakteriše (visoki nivoi IFN- γ i IL-12p40) doprinose stalnoj intestinalnoj inflamaciji u Kronovoj bolesti, te njegovo stišavanje može dovesti do poboljšanja simptoma inflamacije (Macdonald i Monteleone, 2005). Oralna administracija probiotske smeše VSL#3 je prouzrokovala smanjenje nivoa IFN- γ , povećanje populacije Treg i sekreciju TGF- β 1 u mišjem modelu kolitisa (Di Giacinto i sar, 2005). Slični mehanizam olakšanja simptoma inflamacije zabeleženi su nakon konzumacije

probiotika i u drugim autoimunskim i inflamatornim bolestima, kao što su: reumatoidni artritis (Kwon i sar, 2010), inflamatorna bolest creva (O'Mahony i sar, 2005; Kwon i sar, 2010), paučitis (Hart i sar, 2004), encefalomijelitis (Lavasani i sar, 2010). Sa druge strane, Treg indukovane nakon suplementacije probiotskim sojevima blokiraju i Th2 odgovor, što ima pozitivne implikacije u atopijskim stanjima (Kwon i sar, 2010; Kim et, 2014), astmi (Feleszko i sar, 2007), alergiji na hranu (Kim i sar, 2008) itd.

Međutim, određeni sojevi BMK stimulišu DC, koje zatim produkuju interleukine IL-12 i IL-18, aktivirajući na taj način proinflamatorni (Th1) imunski odgovor, ili IL-4, što pokreće Th2 odgovor (Niers i sar, 2005; Niers i sar, 2007). Jačanje Th1 odgovora ima primenu u olakšanju simptoma atopijskih bolesti, ili u prevenciji respiratornih infekcija, posebno u osetljivim populacijama, kao što su deca, sportisti i starije osobe (Niers i sar, 2005; Niers i sar, 2007). U tom smislu, suplementacija *L. paracasei* NCC 2461 je dovela do ojačanja Th1 odgovora u mišjem modelu, što je manifestovano povećanjem koncentracije IgG2a antitela, usled stimulacije B ćelija IFN- γ (Ibnou-Zekri i sar, 2003). Suprotno tome, konzumacija sojeva *L. casei* ATCC 393 i *L. murinus* CNRZ povećali su odnos IgG1/IgG2a bez uticaja na nivo ukupnih IgG antitela u mišjem modelu, što ukazuje na jačanje Th2 imunskog odgovora (Maassen i sar, 2003), odnosno supresiju inflamatornih stanja izazvanim prekomernim Th1 odgovorom.

Na osnovu iznetih podataka, zaključuje se da svaki probiotski soj poseduje specifične MAMP molekulske obrasce, koji su od ključne važnosti za indukciju imunskog odgovora. Hemijska struktura ovih molekula određuje u kom će se pravcu ispoljiti modulacija imunskog sistema. Stoga se povoljni efekti određenog soja ne mogu generalizovati na sve BMK, te efikasnost svakog potencijalnog probiotskog soja najpre treba ispitati u dobro dizajniranoj humanoj kliničkoj studiji.

1.2.5 Probiotici u sportu

Poslednjih godina sprovedeno je više placebo-kontrolisanih studija koje su ukazale na pozitivne imunološke efekte probiotika. S obzirom na rastući broj dokazanih korisnih efekata, suplementacija probioticima može biti od značaja u prevenciji bolesti respiratornog trakta. Aktuelna *Cochrane* meta-analiza o profilaktičkoj upotrebi probiotika, zaključila je da suplementacija probiotskim mikroorganizmima smanjuje broj subjekata koji oboljevaju od

akutnih respiratornih infekcija u odnosu na placebo, kao i da skraćuju dužinu trajanja epizode, upotrebe antibiotika i period izostanka iz škole usled javljanja bolesti. Međutim, dokazi koji potkrepljuju ove tvrdnje su niskog ili vrlo niskog kvaliteta. Meta-analiza je uzela u obzir 12 randomizovanih placebo-kontrolisanih kliničkih studija, koje su zajedno obuhvatile 3720 učesnika, uključujući decu, osobe srednjih godina i starije osobe (Hao et al, 2015).

Prema dostupnim literaturnim podacima, do sada je objavljeno 25 publikacija koje su se bavile tematicom prevencije respiratornih infekcija suplementacijom probiotskim mikroorganizmima, ili njihovom interakcijom sa raznim aspektima imunskog sistema i metabolizma sportista. U nastavku je dat njihov kratak pregled.

Prvi dokazi o korisnosti probiotika u sportskoj populaciji pruženi su u studiji Clancy i sar, 2006, gde je najpre uočena razlika u nivou antigenom stimulisanog IFN- γ u grupi zdravih sportista i grupi koja je osetljiva na javljanje respiratornih infekcija i konstantno oseća umor. Zatim je utvrđeno da se deficit ovoj proinflamatornog citokina može nadoknaditi 4-nedeljnom suplementacijom sojem *L. helveticus* L10, u dnevnoj dozi od 2×10^{10} CFU. Upravo je ovaj soj i predmet istraživanja ove doktorske disertacije. Međutim, ova studija se nije bavila uticajem probiotika na pojavu respiratornih infekcija, za razliku od *cross-over* studije (Cox i sar. 2010), koja je ispitivala uticaj suplementacije *L. fermentum* tokom 4 meseca u zimskoj sezoni. Autori su došli do zaključka da je grupa koja je konzumirala probiotik prijavila kraći period trajanja infekcija od grupe koja je bila na placebo. Ovaj rezultat je doveden u vezu sa povećanjem nivoa antigenom stimulisanog IFN- γ . Zanimljivi rezultati koji su ukazali na različit imunski odgovor na suplementaciju sojem *L. fermentum* među polovima publikovani su u studiji autora West i sar., 2011. Naime, zabeležena je značajna redukcija u GIT i respiratornim simptomima jedino u populaciji muškaraca. Adekvatno objašnjenje za razliku u kliničkim ishodima među polovima za sada nije pronađeno, iako postoje naznake uticaja polnih hormona na imunološki odgovor.

Tri studije su se bavile ispitivanjem uticaja suplementacije sojem *L. rhamnosus* (Kekkonen i sar., 2007; Moreira i sar, 2007, Välimäki i sar., 2012). Suplementacija sojem *L. rhamnosus* GG (LGG) tokom 3 meseca nije sprečila javljanje respiratornih infekcija i alergija, međutim, zabeležen je trend skraćivanja dužine trajanja GIT simptoma u eksperimentalnoj grupi u odnosu na placebo (Kekkonen i sar., 2007, Moreira i sar, 2007). Autori Välimäki i sar., 2012 nisu uočili uticaj soja LGG na lipidni status i nivo oxLDL i odabranih antioksidanata tokom 4-mesečne suplementacije.

Konsumacija *L. casei* je doprinela održanju nivoa sIgA antitela u populaciji vojnika tokom svakodnevnih intenzivnih fizičkih treninga (Tiollier i sar., 2007). Slični efekti su zabeleženi nakon suplementacije sojem *L. casei* Shiota u populaciji sportista (n = 84), što je dovelo do smanjenja učestalosti respiratornih infekcija (Gleeson i sar, 2011). Studija iste istraživačke grupe međutim, nije uočila promenu incidence respiratornih infekcija nakon suplementacije istim sojem u većoj grupi sportista (n = 243), ali je zabeležila smanjenje titra antitela protiv *Epstein Barr* virusa (EBV) i citomegalovirusa (CMV) (Gleeson i sar, 2016). Nedavne dve studije koje su se bavile suplementacijom *L. casei* kod atletičara nisu zabeležile imunološke efekte (Gill i sar, 2016a; Gill i sar, 2016b). Ipak, suplementacija je trajala samo nedelju dana, pa su se ovakvi rezultati mogli i očekivati, s obzirom da je za kolonizaciju GIT-a probiotskim sojevima potrebno 10-14 dana. Slično tome, suplementacija sojem *L. salivariusom* (Gleeson i sar., 2012) takođe nije zabeležila niti jednu promenu imunoloških parametara, niti uticaj na incidencu, trajanje ili ozbiljnost respiratornih simptoma.

Postoji nekoliko publikacija koje su se bavile suplementacijom multikomponentnim probiotskim sojevima (Martarelli i sar., 2011; Lamprecht i sar., 2012; Haywood i sar., 2014; Muhamad & Gleeson, 2014). Ipak, nedostatak većine ovih studija je činjenica da nisu istovremeno praćeni metabolički i imunološki parametri sa klinički značajnim ishodima, kao što je npr. incidenca, težina i trajanje respiratornih i GIT infekcija. Ova raznolikost parametara jasno ilustruje izazov u preciznoj identifikaciji imunoloških, fizioloških i metaboličkih benefita probiotskih sojeva u različitim grupama sportista, s obzirom da je priroda promene klinički značajnih ishoda ključni faktor za sportiste i njihove trenere pri odabiru dijetskih suplemenata (Pyne i sar, 2014). Tako je suplementacija multiprobiotskim proizvodima dovela do smanjenja serumskog nivoa zonulina, parametra GIT propustljivosti i nivoa karbonil-proteina, markera proteinske peroksidacije (Lamprecht i sar., 2012). Kombinacija *L. rhamnosus* i *L. paracasei* tokom 4 nedelje suplementacije dovela je do povećanja antioksidativnog potencijala plazme BAP (eng. *biological antioxidant potential*) (Martarelli i sar., 2011). *Cross-over* studija sa malim brojem ispitanika, profesionalnih ragbista pokazala je smanjenje incidence respiratornih infekcija (Haywood i sar., 2014), što nije potkrepljeno relevantnim imunskim parametrima.

Međutim, velika klinička studija, koja je obuhvatala 465 fizički aktivnih ljudi ukazala je na sposobnost soja *B. lactis* da nakon 28 dana suplementacije redukuje frekvencu respiratornih infekcija za 27% (West i sar., 2014), pri čemu je i utvrđena tolerancija i bezbednost primene

ovog probiotskog soja (Cox i sar, 2014). Ipak, nije uočen značajan efekat suplementacije na nivo CD4+ T-ćelija, CD4+ T-reg (CD127^{lo}Foxp3+ 2 ili CD127^{lo}CD25+) (West i sar, 2016).

Većina navedenih studija se bavila i uticajem probiotskih sojeva na sportske performanse, no ni jedna nije pokazala pozitivne rezultate. Studija novijeg datuma takođe nije ukazala na ergogena spojestva kefira, već je zabeležila smanjenje koncentracije C-reaktivnog proteina (CRP eng. *C-Reactive Protein*), markera inflamacije u krvi trkača nakon maratonske trke (O'Brien i sar, 2015). Ipak, čini se da suplementacija određenim probiotskim sojevima može da poboljša sportske performanse. *Cross-over* studija (Shing i sar., 2014) je pokazala sposobnost multikomponentnog probiotskog proizvoda, koji sadrži sojeve *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* i *Streptococcus* da umereno produži period treniranja do pojave umora u uslovima visoke temperature, kao i da smanji GIT permeabilnost i tegobe u odnosu na placebo grupu. Ovo je ujedno i prva studija koja je obezbedila dokaze o direktnim ergogenim dejstvima probiotika. Zanimljivi su i rezultati *cross-over* studije (Jäger i sar, 2016), koji su pokazali da grupa koja je koristila kombinaciju kazeina i soja *Bacillus coagulans* smanjuje oštećenja mišića, tj. nivo kreatin kinaze, kao i da održava sportske performanse nakon „*Wingate* testa“ u odnosu na grupu koja je konzumirala samo kazein.

Buduća istraživanja o imunskom delovanju probiotskih sojeva moraju da se baziraju na dobro dizajniranim placebo-kontrolisanim kliničkim studijama koje će obuhvatiti procenu kako klinički značajnih ishoda, tako i imunoloških parametara, jer se jedino na taj način mogu obezbediti kvalitetni dokazi o efikasnosti suplementacije probioticima u sportu.

2 Ciljevi istraživanja

Ciljevi studije su:

- Ispitati da li suplementacija sojem *L. helveticus* Lafti® L10, utiče na pojavu, dužinu trajanja i težinu simptoma infekcija gornjeg respiratornog trakta u populaciji vrhunskih sportista;
- Proceniti efekte suplementacije sojem *L. helveticus* Lafti® L10 i intenzivnih treninga na odabrane parametre mukoznog, humoralnog i celularnog imuniteta;
- Proceniti efekte suplementacije sojem *L. helveticus* Lafti® L10 i intenzivnih treninga na odabrane biohemijske parametre (lipidni status, glukoza, bilirubin, mokraćna kiselina i albumin);
- Proceniti efekte suplementacije sojem *L. helveticus* Lafti® L10 i intenzivnih treninga na parametre oksidativnog stresa, oksidativnog statusa i antioksidativne zaštite;
- Ispitati da li suplementacija sojem *L. helveticus* Lafti® L10 utiče na sportske performanse (nivo maksimalnog aerobnog kapaciteta), antropometrijske parametre i telesnu kompoziciju;
- Ispitati da li suplementacija sojem *L. helveticus* Lafti® L10 utiče na subjektivni osećaj anksioznosti, depresije, borbenosti, konfuznosti, snage, zamora, kao i totalnog osećaja uznemirenosti.

3 Ispitanici i metode

3.1 Eksperimentalni dizajn i ispitanici

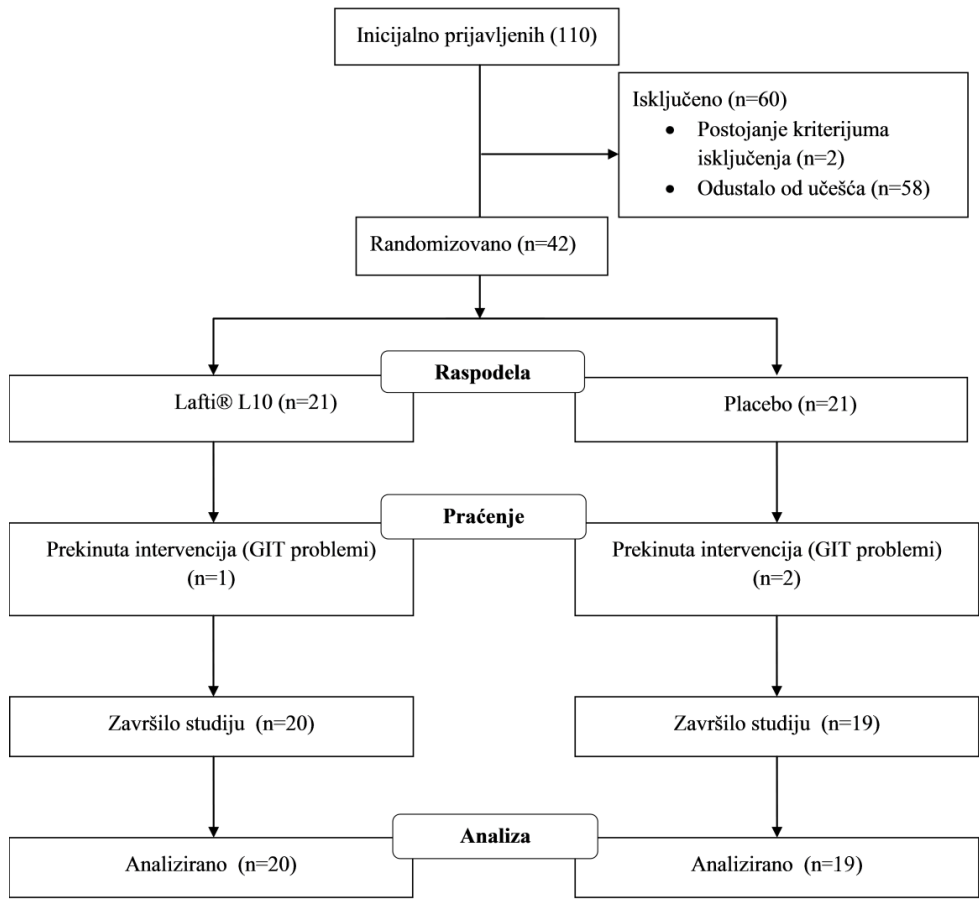
Ispitivanje je sprovedeno kao randomizovana, dvostruko slepa, placebo-kontrolisana klinička studija, prateći standarde Helsinške Deklaracije. Studija je odobrena od strane Etičkog komiteta Udruženja za medicinu sporta Srbije i Etičkog komiteta Farmaceutskog fakulta Univerziteta u Beogradu. Ispitanici su najpre detaljno obavešteni o protokolu, ciljevima, efektima, mogućim rizicima i obavezama učešća u studiji, kao i mogućnosti povlačenja iz studije u svakom trenutku, nakon čega su dali pristanak za dobrovoljno učešće u studiji.

Regrutacija sportista je započeta u martu 2014, a završena je novembra 2014. Decembra 2014. pristupilo se proveriti podobnosti 110 dobrovoljaca za učešće u studiji, što je uključivalo internistički pregled, antropometrijske analize i popunjavanje upitnika o osnovnim demografskim podacima, dijetarnim navikama, stepenu fizičke aktivnosti i istoriji eventualnih oboljenja. Navedena ispitivanja obavljena se u prostorijama ordinacije za sportsku medicinu Vita maxima, Beograd.

Ukupno 42 sportista je uključeno u studiju, dok je ostatak prvobitno prijavljenih odustao ili nije zadovoljavao kriterijume za uključivanje. Nakon regrutacije, sportisti su metodom randomizacije raspoređeni u jednu od grupa, prema maksimalnom plućnom kapacitetu (procenjenog kardiopulmonalnim testiranjem, CPT). Eksperimentalna grupa (označena sa Lafti® L10) je primala kapsule *L. helveticus* Lafti® L10 u dozi od $2 \cdot 10^{10}$ CFU (2 kapsule) proizvođača *Lallemand Health Solutions*, Montreal, Kanada. Kontrolna (placebo) grupa je primala placebo kapsule, koje su bile identične po ukusu i izgledu kapsulama. Placebo kapsule su sadržale 1% magnezijum-stearata i 99% maltodekstrina, dok su kapsule interventne grupe sadržale 72,2% mase bakterijskog soja, 26,7% maltodekstrina i 1% magnezijum-stearata. Kapsule su bile sastavljene od hidroksipropilmetilceluloze (HPMC) i obojene titan-dioksidom (TiO_2). Ispitanicima je savetovano da uzimaju po 2 kapsule svaki dan u isto vreme, posle doručka. Takođe, istraživači su svakog dana bili u telefonskom kontaktu sa sportistima, kako bi osigurali odgovarajuću komplijansu ispitanika. Sportisti i tim ispitivača nisu znali za ishod randomizacije do završetka statističkih analiza.

Suplementacija probioticima je počela sredinom januara 2015. i trajala je 14 nedelja. Sportisti su savetovani da ne koriste antioksidanse, mlečne fermentisane proizvode, kao ni suplemente namenjene jačanju imunskog sistema (preparati na bazi ehinaceje, *Ginseng panaxa*,

propolisa). Tri dana na početku studije sportisti su vodili detaljan dnevnik ishrane. Energetski unos, unos makronutrijenata i mikronutrijenata je izračunat upotrebom CRON-O-Meter v0.9.6 softvera. Unos mikronutrijenata je upoređen sa preporučenim dnevnim unosom (eng. *Dietary Reference Intake* - DRI). Tokom studije, sportisti su se pridržavali ustaljenog režima treniranja i ishrane. Na Slici 12 predstavljen je grafički prikaz dizajna studije.



Slika 12. Prikaz dizajna studije

Ispitanici

Odabrano je 42 profesionalnih sportista: 36 muškaraca (VO_2 max: 50 do 82 mL/kg/min) i 14 žena (VO_2 max: 45 do 57 mL/kg/min). Kriterijumi uključenja su bili: starost 18-30 god, nepušači, ≥ 11 h treniranja nedeljno (što se smatra visokim fizičkim opterećenjem, Gleeson i sar, 2013). Kriterijumi za isključenje su bili: preosetljivost na sastojke probiotika, upotreba probiotika i antibiotika mesec dana pre početka studije, skora hirurška intervencija (prethodne godine), prisustvo hroničnih bolesti (dijabetes melitus, reumatoidni artritis, renalne, plućne, neurološke i psihijatrijske bolesti).

Sportisti uključeni u ispitivanje su trenirali: badminton, triatlon, biciklizam, alpinizam, atletiku, karate, boks, veslanje, džudo, tenis i plivanje. Za razliku od sličnih studija koje su uključivale univerzitetske ili rekreativne sportiste, učesnici ove studije bili su pobednici nacionalnih ili evropskih i svetskih sportskih takmičenja u svojim sportovima i kategorijama. Ukupno 39 sportista je završilo studiju.

Uzorkovanje biološkog materijala

Ispitanicima je bilo naglašeno da pre uzimanja uzoraka ne konzumiraju nikakvu hranu i piće. Laboratorijski tehničar sa licencom iz biohemijske laboratorije Beograd je uzorkovao biološki materijal (venska krv i saliva) ispitanika i to dva puta, pre početka i nakon završetka studije. Uzorci krvi su uzeti iz prednje kubitalne vene, u periodu između 9:30 i 10:30 časova, kako bi se izbegle diurnalne varijacije biohemijskih i imunoloških parametara. Krv je sakupljena vakutejner sistemima sa etilendiaminotetrasirćetnom kiselinom (9 mL) za sakupljanje uzoraka pune krvi i vakutejnerima za dobijanje seruma (10 mL) (BD Vacutainer®, Sjedinjene Američke Države).

Uzorci su zatim čuvani na sobnoj temperaturi u toku 30 minuta, a zatim centrifugirani na 1500xg tokom 10 minuta. Odvojeni uzorci seruma su podeljeni u alikvote i čuvani na -20°C do analize. Uzorkovanje salive je izvršeno na sledeći način: ispitanici su bili u udobnoj poziciji sa glavom blago pognutom napred, što je omogućavalo spontanu salivaciju u sterilne bočice, u trajanju od 2 min. Uzorci su zatim centrifugirani (10000xg, 15min). Supernatant je odvojen, podeljen u alikvote i čuvan na -20°C do analize. Staklene epruvete su pre i nakon sakupljanja salive izmerene na analitičkoj vagi. Pod pretpostavkom da je specifična težina salive 1 g/mL, težina salive u gramima je prevedena u mililitre, a zatim podeljena sa 2 (sakupljanje uzorka je

trajalo 2 minuta), kako bi se izračunao salivarni protok (mL/min). Nakon uzorkovanja biološkog materijala, sportisti su biti podvrgnuti kardiopulmonalnom testiranju, u svrhu određivanja nivoa maksimalnog aerobnog kapaciteta.

Mesto sprovođenja istraživanja

Istraživanje je sprovedeno u okviru sledećih ustanova:

1. Katedra za bromatologiju i Katedra za medicinsku biohemiju, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu;
2. Institut za virusologiju, vakcine i serume, Torlak, Odsek za naučno-istraživački rad, Beograd;
3. Ordinacija za sportsku medicinu Vita maxima, Beograd.

Laboratorija „Beograd“ je izvršila analizu biološkog materijala na uobičajene biohemijske parametre. Iz prikupljenih uzoraka u laboratorijama Katedre za bromatologiju i na Institutu za virusologiju, vakcine i serume Torlak su određivani odabrani imunološki parametri, dok su na Katedri za medicinsku biohemiju određeni parametri oksidativnog stresa, oksidativnog statusa i antioksidativne zaštite. Uzorkovanje salive i krvi, antropometrijska merenja i kardiopulmonalni test su obavljani u prostoru ordinacije za sportsku medicinu „Vita maxima“.

Antropometrijska merenja

Na početku studije, ali i nakon završetka studije, izvršeno je antropometrijsko merenje na vagi BC-418, na bazi bioimpedance (Tanita, Tokyo, Japan). Određeni su telesna masa i procenat telesne masti. Visina je izmerena na prenosivom stadiometru sa tačnošću od 0,1 cm. ITM je izračunat kao odnos telesne mase u kilogramima i visine u metrima stepenovane sa 2 (kg/m²).

3.2 Kardiopulmonarni test

Ergospirometrijsko ispitivanje je izvršeno na pokretnoj traci (*Quark b2-Cosmed*). Maksimalni test opterećenja podrazumeva da se otpor, odnosno intezitet fizičke aktivnosti postepeno povećava, dok se pritom meri odnos koncentracije udahnutog kiseonika i izdahnutog

ugljen-dioksida. Sportista u toku testa nosi masku na licu, dok se inspirijum i ekspirijum mere posebnom aparaturom. Maksimalni aerobni kapacitet (VO_{2max}) se dostiže kada se potrošnja kiseonika ustali na nekom nivou i pored povećavanja opterećenja. VO_{2max} predstavlja maksimalnu potrošnju kiseonika koji organizam može da transportuje i iskoristi tokom postepenog povećanja intenziteta fizičke aktivnosti (Baralić, 2012). Tokom izvođenja ergospirometrijskog testiranja, praćeni su određeni parametri, koji na posredan način ukazuju na funkcionalnu sposobnost. To su: maksimalna srčana frekvencija (HR max) koja se dostigne tokom testa opterećenja; što je veća njena vrednost, brže je i zamaranje; zatim vrednosti oporavka tokom prvog, drugog i trećeg minuta; maksimalna brzina koja je dostignuta tokom testiranja (v_{max}); respiratorni koeficijent, kao i vreme trajanja testa.

3.3 Laboratorijske metode

Kod ispitanika su određivani sledeći parametri:

- **Antropometrijski podaci:** uzrast, visina, težina, indeks telesne mase (ITM), procenat masti, vode i bezmasne mase tela
- **Aerobni kapacitet - VO_{2max}**
- **Odabrani biohemijski parametri:**
 - lipidni status: ukupni holesterol, LDL holesterol, HDL holesterol, trigliceridi
 - ukupni bilirubin, albumin, mokraćna kiselina, glukoza
- **Odabrani imunološki parametri:**
 - mukoznog imuniteta: salivarni protok, brzina izlučivanja sIgA, apsolutna koncentracija sIgA antitela, nivo specifičnih anti-*L. helveticus* Lafti® L10, anti-*L. plantarum* WCFS1, anti-*L. rhamnosus* LA68, anti-*L. acidophilus* ViVag IgA antitela u salivi;
 - humoralnog imuniteta: nivo ukupnih IgA, IgG i IgM antitela u serumu, nivo specifičnih anti-*L. helveticus* Lafti® L10, anti-*L. plantarum* WCFS1, anti-*L. rhamnosus* LA68, anti-*L. rhamnosus* LB64, anti-*E. coli*, anti-*P. mirabilis* i anti-*E. faecalis* IgA, IgG i IgM antitela u serumu;

- celularnog imuniteta: diferencijalna leukocitarna formula (broj limfocita, monocita i granulocita) i udeo leukocitnih populacija: CD3+CD4+ (pomoćničke T ćelije), CD3+CD8+ (pomoćničke citotoksične ćelije), CD4+CD45RO+ (memorijske T pomoćničke ćelije), CD8+CD45RO+ (memorijske citotoksične ćelije), CD19+ (B ćelije) i CD11b+ ćelije (ćelije koje ekspimiraju Mac-1 ili CR3, a vezane su za migraciju leukocita, celularnu adheziju i fagocitozu), vijabinost mononuklearnih ćelija periferne krvi nakon stimulacije antigenima konkanavalinom A, lipopolisaharidom, peptidoglikanom i bakterijama *Lactobacillus helveticas* Lafti® L10, citokinski odgovor: nivo IFN- γ , IL-4, IL-10 nakon stimulacije antigenima konkanavalinom A, lipopolisaharidom, peptidoglikanom i bakterijama *Lactobacillus helveticas* Lafti® L10 i nivo TGF- β 1 u serumu.

3.3.1 Određivanje parametara mukoznog, humoralnog i celularnog imuniteta

3.3.1.1 Određivanje parametara mukoznog i humoralnog imuniteta

Određivanje koncentracije ukupnih IgA antitela u salivi

Reagensi:

ELISA komercijalni test (IBL®, Hamburg, Nemačka):

ELISA ploča obložena anti-IgA antitelom

anti – IgA antitelo kuplovano sa peroksidazom

IgA standardi koncentracija: 0; 6.9; 62; 132; 400 ng/mL.

BSA puffer: 25 mM, pH=7.4; BSA 0,5 g/L

TMB substrat: TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin) 0,26 g/L vezan za vodonik-peroksid

Rasvor za ispiranje: NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L

Stop rastvor: sumporna kiselina 0,15 mol/L

Postupak:

Uzorci su analizirani korišćenjem komercijalnog testa (IBL®, Hamburg, Nemačka), prema uputstvima proizvođača. Uzorci salive su razblaženi 1000 puta i potom centrifugirani 15 min na 10000 x g. U mikrotitarske ploče sipano je po 25 μ L uzorka po bazečnicu, a nakon

ispiranja po 100 μ L anti-IgA antitela kuplovanog sa peroksidazom. Nakon inkubacije u trajanju od 1 h na sobnoj temperaturi, ploče su ispirane 3 puta rastvorom za ispiranje, a zatim je dodat TMB sustrat, koji je u mraku na sobnoj temperaturi inkubiran sa uzorcima tokom 15 min. Reakcija razvijanja boje je prekinuta dodatkom stop rastvora, a ELISA čitačem merena je absorbanca na 450 nm. Brzina izlučivanja sIgA u salivi se dobija množenjem apsolutne koncentracije sIgA (mg/mL) i salivarnog protoka (mL/min).

Lowry-jeva metoda za određivanje koncentracije proteina u salivi

U reakciji peptidnih veza i bakarnih jona u alkalnoj sredini nastaje kompleks koji uz oksido-redukcionu reakciju fosfomolibdensko-fosfovolframovog reagensa sa tirozinom daje postojanu boju, čija se absorbanca meri na 500-600 nm (makrometoda) ili 750 nm (mikrometoda). Kada se radi u mikrotitar pločicama meri se apsorbancija u opsegu 600-660 nm, zavisno od raspoloživog filtra.

Reagensi:

Reagens A: 2% Na_2CO_3 u 0,1M NaOH (Sigma Aldrich)

Reagens B: 1% rastvor $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Sigma Aldrich)

Reagens C: 2% rastvor K-Na-tartarata (Sigma Aldrich)

Reagens C:

Reagens A 98 mL

Reagens B 1 mL

Reagens C 1 mL

Folin-Ciocalteu reagens, razblažen po uputstvima proizvođača (Sigma Aldrich)

Standardni rastvor BSA polazne koncentracije 1,0 mg/mL (Sigma Aldrich)

Postupak:

U staklene epruvete se odmerava se po 20 μ L uzorka, a zatim se dodaje 300 μ L rearena C. Smesa se vorteksira i inkubira 15 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim se u svaki uzorak dodaje po 60 μ L Folin-Ciocalteu reagensa. Smeša se vorteksira, a zatim se nakon 30 minuta meri absorbanca na 570 nm. Na osnovu dobijenih vrednosti apsorbancija za poznate koncentracije

BSA dobija se standardna kriva, sa koje se određuje koncentracija proteina u uzorcima salive (Lowry i sar, 1951).

Procedura umnožavanja bakterija

Reagensi:

MRS medijum (Institut za virusologiju, vakcine i serume, Torlak)

Kulture ćelija *Laktobacillus sp.*, *Escherichia Coli*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis* (Institut za virusologiju, vakcine i serume, Torlak)

PBS (Sigma Aldrich)

hranljivi bujon (Institut za virusologiju, vakcine i serume, Torlak)

Postupak:

Laktobacilusi su gajeni u MRS medijumu na 37°C, u inkubatoru, bez mućkanja tokom 24 h, u vajlama od 50 mL. Prekonoćna kultura je centrifugirana na 2000 x g 20 min, zatim je ispirana PBS-om, i postupak je ponovljen još jednom. Finalno je kultura resuspendovana u 25 mL PBS-a.

Patogene bakterije – klinički izolati *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* i *Enterococcus faecalis*, pokupljeni su sa čvrste podloge, po jedna kolonija, resuspendovani u hranljivom bujonu u vajlama od 50 mL i gajeni na 37°C. Prekonoćna kultura je centrifugirana na 2000 x g 10 min, zatim je isprana PBS-om, i postupak je ponovljen još jednom. Finalno je kultura resuspendovana u 25 mL PBS-a.

Određivanje broja bakterija, vršeno je pomoću hemocitometra, u odeljku za brojanje eritrocita. Broj od 1×10^8 /mL, je dobijen razblaživanjem i predstavljao je odgovarajući broj. Ovako dobijeno razblaženje bakterija je korišćeno za merenje optičke gustine na 620 nm, u ELISA čitaču i svi bakterijski uzorci razblaživani su dok nije postignuta ista optička gustina.

Detekcija antitela specifičnih na bakterije u serumu i salivi

Reagensi:

Kulture ćelija *L. plantarum* WCFS1, *L. rhamnosus* LA68, *L. rhamnosus* LB64, *L. acidophilus* ViVag, *Escherichia Coli*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis* (Institut za virusologiju, vakcine i serume, Torlak)

ELISA ploča sa 96 mesta

2% BSA/PBS

PBS, 1%, 2%

IgG antitelo (monoklonsko Anti-Humano IgG Fc specifično, vezano za biotin, Sigma Immuno Chemicals)

IgM antitelo (Anti-Humani IgM specifičan za μ -lanac, vezan za biotin, Sigma Immuno Chemicals)

IgA antitelo (Anti-Humani IgA specifičan za α -lanac, vezan za biotin, Sigma Immuno Chemicals)

HRP streptavidin (Sigma Immuno Chemicals)

o-fenil diamin (OPD Sigma Life Science)

Stop reagens: 1 M sumporna kiselina

Postupak:

Postupak je izveden prema referenci Stojanović i sar., 2004, sa minimalnim modifikacijama. Smrznute prekonoćne kulture bakterija (*Laktobacillus sp.*, *Escherichia Coli*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis*) nakon razblaživanja do željene bakterijske gustine od 1×10^8 bakterija/mL, nanose se (50 μ L) na ELISA ploču. Nakon centrifugiranja (1000xg, 15 min) tečnost se uklanja iz bazenčića, a bakterijski talog se suši na 50° C, u trajanju od 2 h. Ploča se zatim blokira pomoću 2% BSA/PBS-u, vrši se inkubacija na 37° C u trajanju od 1 h. Zatim se serum razblažuje 400 puta u 1%BSA/PBS-u za analizu IgG i IgM, tj. 50 puta za analizu IgA antitela. Potom se vrši nanošenje uzoraka (50 μ L) i standarda i sledi prekonoćna inkubacija ploče na 4°C. Ploča se ispira 3 puta rastvorom PBS. Vezana serumska antibakterijska antitela detektuju se antitelima specifičnim za humane klase imunoglobulina: IgG (razblaženje 1:2000), IgM (razblaženje 1:2500), IgA (razblaženje 1:2500). Nakon inkubacije od 1 h na 37°C, ploča se ispira PBS-om, a potom se dodaje streptavidin-peroksidaza, razblažena 2000 puta u 1%BSA/PBS. Vršiti se inkubacija od 45 min na 37°C, nakon čega sledi ponovno ispiranje ploče. Konačno, dodaje se o-fenil diamin (50 μ L), a nakon 15 min reakcija razvijanja boje se zaustavlja stop reagensom (50

μL). Neposredno nakon stopiranja reakcije, na ELISA čitaču meri se absorbanca na 492 nm i 620 nm.

Za određivanje koncentracije salivarnih IgA antitela, specifičnih prema bakterijama, uzorci salive su razblaženi 50 puta. Na ploče sa bakterijama naneto je po 50 μL u svaki bazenčić, nakon čega je korišćen isti postupak kao i za određivanje serumskog IgA.

Određivanje ukupnih IgG, IgA i IgM antitela u serumu

Nakon alikvotiranja, uzorci seruma su poslani akreditovanoj biohemijskoj laboratoriji „Beograd“, gde je određen nivo ukupnih IgG, IgA i IgM antitela, primenom standardnih imunochemijskih automatizovanih metoda na automatskom analizatoru Ilab, Boston, Roshe, Indianapolis, Sjedinjene Američke Države (SAD), Hitachi, Tokio, Japan.

3.3.1.2 Određivanje parametara celularnog imuniteta

Određivanje diferencijalne leukocitarne formule i apsolutnog broja leukocitnih populacija

Reagensi

Rastvor za liziranje: za 100 mL: amonijum-hlorid 8,99 g, KHCO₃ 1 g i Na₄EDTA 37 mg, pH 7.3
BSA (eng. *bovine serum albumin*), albumin seruma govečeta, (Sigma Aldrich)

PBS (eng. *Phosphate-buffered saline*), fiziološki rastvor puferovan fosfatom: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,2-7,4 (Sigma Aldrich)

Antitela (Immunotools, Friesoythe, Nemačka): anti-CD3 (OKT-3 mišje IgG2a antitelo obeleženo FITC), anti-CD4 (MEM-241 mišje IgG1 antitelo obeleženo PE), anti-CD8 (HIT8a mišje IgG1k antitelo obeleženo PE), CD19 (LT19 pacovsko IgG1 antitelo obeleženo FITC), anti-CD56 (MEM-188 mišje IgG2a antitelo obeleženo PE), anti-CD11b (MEM-174 mišje IgG2a antitelo obeleženo FITC) i anti-CD45RO (UCHL1 mišje IgG2a antitelo obeleženo FITC)

Formaldehid (Sigma Aldrich)

Postupak:

Uzorci pune krvi korišćeni su za određivanje diferencijalne leukocitarne formule (apsolutnog broja limfocita, monocita i granulocita) i apsolutnog broja leukocitnih populacija. U epruvete za protočnu citofluorimetriju je dodato 100 μ L krvi i 4 μ L antitela. Nakon inkubacije (20 min, 20 °C na tamnom mestu) dodato je 2 mL rastvora za liziranje, suspenzija je vortkesirana i ponovo inkubirana tokom 10 min na 20 °C. Suspenzija je zatim centrifugirana na 400xg tokom 10 min, supernatant je aspiriran i ispran sa 3 mL 2% BSA/PBS. Nakon pranja, dodato je 200 μ L PBS sa 0,4% FA. Signal je analiziran na FACSVerse (BD Biosciences, San Jose, SAD). Računanje apsolutnog broja leukocitnih populacija CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD4+CD45RO+, CD8+CD45RO+, CD19+ ćelija izvršeno je na osnovu apsolutnog broja limfocita, dok je apsolutni broj CD11b+ izračunat iz apsolutnog broja leukocita. Pojedinačni udeli leukocitnih populacija su procenjeni na osnovu rezultata protočne citofluorimetrije.

Određivanje odgovora citokina nakon stimulacije antigenima

Reagensi:

Histopaque 1077 (Sigma Aldrich)

RPMI 1640 (Sigma Aldrich)

50 μ M β -merkaptotanol (Sigma Aldrich)

FCS (eng. *fetal calf serum*, FCS) , fetalni serum govečeta (Sigma Aldrich)

ConA: konkavalin A *Canavalia ensiformis*, koncentracije 10 μ g/mL (Sigma Aldrich)

LPS: lipopolisaharidi iz *Salmonella minnesota*, koncentracije 10 μ g/mL (Sigma Aldrich)

PGN (peptidoglikan iz *Staphylococcus aureus*, koncentracije 10 μ g/mL (BioChemika, Fluka)

Termički ubijene bakterije *L. helveticus* Lafti® L10, koncentracije 1x10⁷/mL (*Lallemend Health Solutions*, Montreal, Canada)

ELISA duoset kit (R&D Systems®, Mineapolis, SAD), Ancillary Reagent kit (R&D Systems®, Mineapolis, SAD):

ELISA mikrotitarske ploče sa 96 mesta

PBS

Pufer za ispiranje: 0.05% Tween® 20 u PBS, pH 7,2-7,4

Pufer za blokiranje: 1% BSA u PBS, pH 7,2-7,4

Reagens za rastvaranje: 0,1% BSA, 0,05% Tween®20 u TBS (20 mM Trizma baza, 150 mM NaCl) pH 7,2-7,4

Supstrat: smesa u odnosu 1:1 reagensa A (vodonik-peroksid) i reagensa B (tetrametilbenzidin)

Stop rastvor: 2 M sumporna kiselina

Streptavidin-HRP: streptavidin kuplovan sa peroksidazom

Mišja anti-humana IL-4 antitela, koncentracije 4,0 µg/mL, rastvorena u reagensu za rastvaranje

Mišja anti-humana IL-10 antitela, koncentracije 2,0 µg/mL, rastvorena u reagensu za rastvaranje

Mišja anti-humana IL-4 antitela, koncentracije 4,0 µg/mL, rastvorena u reagensu za rastvaranje

Kozja anti-humana IL-4 antitela, vezana za biotin, koncentracije 75 ng/mL, rastvorena u reagensu za rastvaranje

Kozja anti-humana IL-10 antitela, vezana za biotin, koncentracije 150 ng/mL, rastvorena u reagensu za rastvaranje

Kozja anti-humana IL-4 antitela, vezana za biotin, koncentracije 75 ng/mL, rastvorena u reagensu za rastvaranje

IL-4, IL-10, IFN-γ standardi: standardni rastvori raspona koncentracija 31,5-2000 pg/mL

Postupak:

PBMC su odvojene na Histopaque 1077, resuspendovane u smeši 10% FCS/50 µM β-merkaptotanol/RPMI 1640 i oprane 2 puta.

Vijabilnost ovog ćelijskog preparata je određena Tripan blue exclusion testom (pomešano je 50 µl razblažene suspenzije limfocita sa 50 µl Trypan blue boje) i ćelije su izbrojane u A kvadratima Neuber-ove komore. Broj ukupnih i vijabilnih ćelija je izvršeno prema sledećoj formuli:

Broj ćelija/mL = srednja vrednost broja ćelija u A-kvadratima x Razblaženje x 10 000

% vijabilnosti = broj živih ćelija / ukupan broj ćelija x 100

Određena vijabilnost ćelija je bila veća od 95%. Nakon provere vijabilnosti, ćelije su razblažene u smeši 10% FCS/50 µM β-merkaptotanol/RPMI 1640 do koncentracije od 1×10^6 ćelija/mL. Ovako dobijena suspenzija ćelija je na odgovarajući način stimulisana, nakon čega je praćena metabolička aktivnost ćelija, a supernatanti su izdvojeni i korišćeni za određivanje citokina.

Stimulacija ćelija je izvršena na sledeći način: 1×10^6 ćelija/mL je stimulisano *in vitro* sa 10 µg/mL ConA, LPS, PGN i termički ubijenih bakterija soja *L. helveticus* Lafti® L10. Ćelije su uzgajane na 37°C i 5 % CO₂ tokom perioda od 24 h. Nakon centrifugiranja na 400xg tokom 10 minuta na temperature od 4 °C, bazenčići ELISA ploča su ispunjeni sakupljenim supernatantom, a zatim su zamrznuti na -20°C do analize. Nivoi IFN-γ, IL-10 i IL-4 su određeni komercijalnim ELISA testom, po uputstvu proizvođača.

Mišja anti-humana IL-4 (IL-10, IFN-γ) antitela su rastvorena u PBS-u, adsorbovana na polistrensku ELISA ploču (100 µL) i ostavljena preko noći na sobnoj temperaturi. Nakon uklanjanja tečnosti iz bazenčića, vrši se ispiranje puferom za ispiranje (400 µL) 3 puta. Zatim se u bazenčiće dodaje po 300 µL pufera za blokiranje, koji blokira višak slobodnih mesta za vezivanje na ploči. Ploča se potom inkubira 1 sat na sobnoj temperaturi. Nakon uklanjanja tečnosti iz bazenčića i ispiranja ploče, vrši se dodavanje standarda i uzoraka u zapremini od 100 µL. Ploča se inkubira 2 sata na sobnoj temperaturi. Zatim se vrši ispiranje ploče, a potom se dodaju kozja IL-4 (IL-10, IFN-γ) antitela vezanih za biotin u zapremini od 100 µL, nakon čega se ploča ponovo inkubira 2 sata na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja ploče, vrši se dodavanje 100 µL streptavidin-HRP, ploča se inkubira tokom 20 minuta, a zatim se ploča ponovo ispira. Potom se dodaje 100 µL supstrata i vrši se inkubacija od 20 minuta. Reakcija razvijanja boje se prekida dodatkom 50 µL stop rastvora, dok se čitanje absorbance vrši na talasnoj dužini od 450 nm na ELISA čitaču (Victor2 Multilabel Counter, Wallac).

Određivanje nivoa TGF-β1 u serumu

Reagensi:

ELISA mikrotitarske ploče sa 96 mesta (NUNC Maxisorp®)

Komercijalni ELISA kit (Human/Mouse TGF beta 1 ELISA Ready-SET-Go, eBioscience, San Diego, SAD):

PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,2-7,4

Pufer za ispiranje: 0.05% Tween® 20 u PBS, pH 7,2-7,4

Reagens za rastvaranje: 10% FBS

1 N HCl

1 N NaOH

Antitela za adsorpciju

Antitela za detekciju, vezana za biotin

Standardi

Peroksidaza obeležena avidinom

Supstrat: tetrametilbenzidin (TMB)

Stop rastvor: 2 M sumporna kiselina

Postupak:

Nivo TGF- β 1 je određen u serumu pomoću komercijalnog ELISA kita (Human/Mouse TGF beta 1 ELISA Ready-SET-Go, eBioscience, San Diego, SAD). Uzorci su određivani u duplikatu, dok je koeficijent varijacije iznosio 11%.

Antitela su rastvorena u PBS, adsorbovana na polistrensku ELISA ploču (100 μ L) i ostavljena preko noći na temperaturi 4°C. Nakon uklanjanja tečnosti iz bazenčića, vrši se ispiranje puferom za ispiranje (300 μ L) 3 puta. Zatim se u bazenčiće dodaje po 200 μ L pufera za blokiranje. Nakon uklanjanja tečnosti iz bazenčića i ispiranja ploče, vrši se dodavanje standarda i uzoraka u zapremini od 100 μ L (uzorci su prethodno razblaženi rastvorom za razblaživanje u odnosu 1:7). Ploča se inkubira 2 sata na sobnoj temperaturi. Zatim se vrši ispiranje ploče, a potom se dodaju antitela za detekciju, obeležena biotinom, u zapremini od 100 μ L, nakon čega se ploča ponovo inkubira 1 sat na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja ploče, vrši se dodavanje 100 μ L peroksidaze obeležene avidinom, ploča se inkubira tokom 30 minuta, a zatim se ploča ponovo ispira. Potom se dodaje 100 μ L supstrata i vrši se inkubacija od 15 minuta. Reakcija razvijanja boje se prekida dodatkom 50 μ L stop rastvora, dok se čitanje absorbance vrši na talasnoj dužini od 450 nm na ELISA čitaču (Victor2 Multilabel Counter, Wallac).

Svi uzorci za ELISA analize su uneti u duplikatu; srednja prosečna vrednost je uzeta kako reprezentativna. Na osnovu dobijenih vrednosti za absorbancu koje odgovaraju standardnim rastvorima, regresionom analizom se računa jednačina prave, na osnovu koje se izračunava koncentracija uzorka.

MTT test – test vijabilnosti mononuklearnih ćelija periferne krvi nakon stimulacije antigenima

Reagensi:

3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliumbromid (MTT) (Sigma Aldrich)

RPMI podloge (bez fenol crvenog) (Sigma Aldrich)

10% natrijum-dodecil-sulfata (engl. *sodium dodecyl sulfata*, SDS) (Sigma Aldrich)

10 mM HCl (Sigma Aldrich)

Postupak:

Za procenu vijabilnosti, mononuklearne ćelije periferne krvi su pripremljene i stimulisane antigenima PGN, ConA i LPS i termički ubijenih bakterija soja *L. helveticus* Lafti® L10 na isti način kao i za procenu citokinskog odgovora, jedino je inkubacija sa antigenima trajala 48 h. Ploče sa ćelijskom kulturom su nakon 48 h centrifugirane na 400 x g u toku 10 min nakon čega su supernatanti odbačeni. U svaki bazenčić je dodato po 100 µL RPMI podloge (bez fenol crvenog) sa dodatkom 500 µg MTT/mL i ćelije su inkubirane na (37 °C, 5% CO₂: 4 h). Nakon toga, u cilju rastvaranja zaostalih kristala, u svaki bazenčić je dodato po 100 µl 10% SDS u 10 mM HCl. Nakon inkubacije na 37 °C u toku 24 h, na spektrofotometru (Ascent 6-384 [Suomi], MTX Lab Systems Inc., Vienna, VA 22182, SAD) je merena apsorbancija na 580 nm.

3.3.2 Određivanje lipidnog statusa i biohemijskih parametara

Nakon alikvotiranja, uzorci seruma su poslani akreditovanoj biohemijskoj laboratoriji „Beograd“, gde su određeni nivoi parametara lipidnog statusa, kao i biohemijskih parametara: mokraćne kiseline, glukoze, bilirubina i albumina. Biohemijski parametri su određeni rutinski, primenom standardnih spektrofotometrijskih automatizovanih metoda na automatskom analizatoru Ilab, Boston, Roshe, Indianapolis, SAD, Hitachi, Tokio, Japan.

Određivanje verovatnoće za pojavu aterosklerotskih promena na arterijama

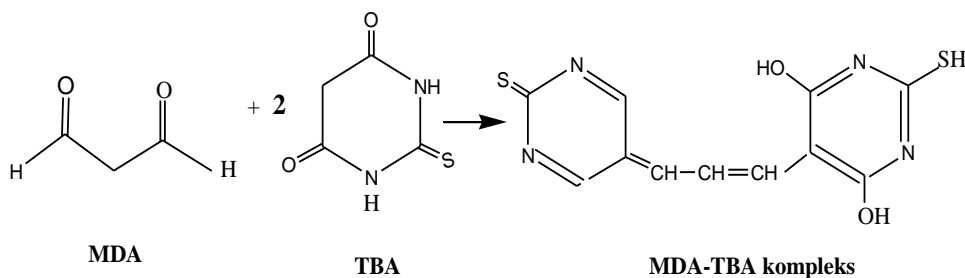
Metoda za procenu verovatnoće za pojavu aterosklerotskih promena na koronarnim arterijama (KA) i abdominalnim arterijama (AA) u populaciji mladih ljudi je prethodno opisana u publikaciji autora McMahan i sar, 2005. Ukratko, faktori kao što su pol, godine, nivo HDL-C i ne-HDL-C, pušački status, krvni pritisak, gojaznost i hiperglikemija uzeti su obzir pri kvantifikaciji rizika za razvoj ateroskleroze u kasnijem životnom dobu.

3.3.3 Određivanje parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite

Nivoi parametara oksidativnog stresa (svi osim nivoa MDA i PAB), oksidativnog statusa i antioksidativne zaštite su određeni na automatskom analizatoru ILab 300+, proizvođača Biosystems S.A. (Barcelona, Spain), nakon optimizacije originalnih metoda u laboratoriji Katedre za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta u Beogradu. Za analizu svih parametara korišćen je serum, dok je MDA, TOS i TAS dodatno određena i u izolovanim HDL i LDL frakcijama. Svi reagensi za određivanje navedenih parametara su nabavljeni od proizvođača Sigma Aldrich.

Određivanje koncentracije malondialdehida (MDA)

MDA je jedan od krajnjih produkata lipidne peroksidacije polinezasićenih kiselina u ćelijama i ima sposobnost da reaguje sa tiobarbiturnom kiselinom i gradi obojeno jedinjenje, čiji je maksimum asorbance na 535 nm (Girotti i sar, 1991). Princip ove metode se zasniva na sledećoj reakciji (Slika 13):



Slika 13. Mehanizam reakcije MDA sa tiobarbiturnom kiselinom

Reagensi:

TBA Reagens: 0,917 mmol/L trihlorsirćetna kiselina (TCA, 15% rastvor), 2,6 mol/L (0,375%)

TBA-tiobarbiturna kiselina, 0,25 mol/L

TRIS-Cl pufer 0,05 mol/L, pH 7,4

Koncentrovani standard MDA, malonaldehid bis(dimetil acetal) ili 1.1.3.3-tetraetoksipropan (Sigma Aldrich)

Postupak:

Postupak se izvodi prema šemi predstvaljenoj u Tabeli 4. Epruvete se vorteksiraju i inkubiraju na 100°C, u vodenom kupatilu 5 minuta. Nakon hlađenja, vrši se centrifugiranje (10000xg, 10 minuta, +4°C), supernatanti se nanose na mikrotitarsku ploču i očitava se apsorbancija na 535 nm na ELISA čitaču (Victor2 Multilabel Counter, Wallac). Za izračunavanje koncentracije MDA korišćena je standardna kriva, koja se konstruiše na osnovu standarda koncentracija u rasponu od 1-10 µmol/L.

Tabela 4. Postupak za određivanje MDA

	Slepa proba	Standard	Analiza
Plazma (mL)	-	-	0,3
TRIS-Cl pufer (mL)	0,3	-	-
Standard (mL)	-	0,3	-
TBA reagens (mL)	0,6	0,6	0,6

Određivanje uznapredovalih produkata oksidacije proteina (AOPP)

Spektralnom analizom razblaženog uzorka plazme ili seruma fosfatnim puferom pH 7,4 u opsegu talasnih dužina 200-400 nm uočava se karakterističan pik oko 340 nm. Dodavanjem sirćetne kiseline u razblažen serum i rastvora kalijum-jodida 1,16 M, dolazi do promene apsorbancije koja se meri na 340 nm. Koncentracija AOPP se izražava preko ekvivalenata

hloramina T koji se koristi za izradu standardne krive u koncentracijama 10-100 $\mu\text{mol/L}$, pri čemu njegova apsorbancija linearno raste sa porastom koncentracije (Selmeci L, 2005).

Reagensi:

Standardni rastvor hloramina T (N-hloro-p-toluensulfonamid natrijum) koncentracije 100 $\mu\text{mol/L}$

Glacijalna sirćetna kiselina

Rastvor kalijum jodida koncentracije 1,16 M

Fosfatni pufer 20 mM, pH 7,4

Postupak:

Za određivanje standardne krive mogu se koristiti koncentracije Hloramina-T: 12,5, 25, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$ pripremljene od Hloramin-T stock rastvora (100 $\mu\text{mol/L}$). Glacijalna sirćetna kiselina izmešana sa PBS u odnosu 1:8 čini reagens 1(R1), dok reagens 2 (R2) sadrži kalijum-jodid pripremljen takođe u PBS. Uzorku seruma, odnosno standardu (60 μL) se dodaje 300 μL R1 i nakon inkubacije od 60 s očitava se prva apsorbancija uzorka. Nakon dodavanja kalijum-jodida reakcionoj smeši i inkubacionog intervala od 180 s, očitava se absorbanca ponovo na talasnoj dužini 340 nm. Koncentracija AOPP se izračunava iz standardne krive ili pomoću jednačine prave, a izražava se u jedinicama $\mu\text{mol/L}$ ekvivalenata Hloramina T.

Određivanje totalnog oksidativnog statusa u serumu (TOS)

Kao glavne komponente TOS u serumu su prisutni vodik-peroksid i lipidni hidroperoksidi. Ukupni oksidansi prisutni u uzorku oksiduju fero jon-orto-dianizidni kompleks u feri jon. Reakcija oksidacije olakšana je molekulom glicerola koji je prisutan u reakcionom medijumu. Nastali feri jon zatim gradi obojeni kompleks sa ksilenol-oranžom u kiseloj sredini. Intezitet boje se meri spektrofotometrijski ($\lambda=560$ nm) i proporcionalan je ukupnom sadržaju oksidacionih molekula u uzorku. Kao standard se koristi vodeni rastvor vodonik-peroksida opsega koncentracije 10-200 $\mu\text{mol/L}$, što odgovara linearnosti metode i očekivanim koncentracijama u biološkom materijalu (Erel O, 2005).

Reagensi

Reagens 1-TOS 1: Pripremljen je rastvaranjem ksilenol-oranža (114 mg) i NaCl (8,18 g) u 900 mL rastvora H₂SO₄ (c=25 mM). U tako dobijeni rastvor dodato je 100 mL glicerola. pH vrednost ovog reagensa treba podesiti na 1,75.

Reagens 2- TOS 2: Pripremljen je rastvaranjem feroamonijum sulfata (1,96 g) i o – dianizidin dihidrohlorida (3,17 g) u 1000 mL rastvora H₂SO₄ (c=25 mM).

Postupak:

Postupak odedivanja TOS-a se sastoji iz nekoliko koraka (Tabela 5). U reakcione epruvete se prvo pipetira po 450 µL TOS 1 rastvora, zatim po 22 µL rastvora TOS 2 i na kraju po 70 µL seruma, standarda odnosno dejonizovane vode u odgovarajuće epruvete. Sadržaj se promeša i inkubira 3 – 4 minuta, nakon čega se apsorbancije čitaju na spektrofotometru pri talasnoj dužini od 560 nm.

Tabela 5. Postupak određivanja TOS

	<i>ANALIZA</i>	<i>STANDARD</i>	SLEPA PROBA
TOS 1	450µl	450µl	450µl
TOS 2	22µl	22µl	-
SERUM	70µl	-	-
DEJONIZOVANA VODA	-	-	70µl
STANDARD	-	70µl	-

Određivanje totalnog antioksidativnog statusa u serumu (TAS)

Za određivanje totalnog antioksidativnog statusa korišćena je metoda koju je formulisao Erel, uz odgovarajuće modifikacije (Erel, 2004), u smislu prilagođavanja preporučenih zapremina standardnim zapreminama ELISA ploče. Totalni antioksidativni status određen je kolorimetrijskim testom uz upotrebu stabilnog 2,2'-azinobis-(3- etilbenzotiazolin)-6-sulfonska kiselina katjona (ABTS+) kao hromogena. Sam rastvor ABTS-a je bezbojan, ali prilikom oksidacije do ABTS+ katjona, vodonik-peroksidom u kiselom medijumu, dolazi do razvijanja

karakteristične smaragdne boje rastvora. Ukoliko se obojeni ABTS+ jon pomeša sa supstancom koja poseduje redukcionu osobinu (antioksidansom), redukuje se do ABTS-a, što se manifestuje obezbojavanjem ispitivanog rastvora. Intenzitet obezbojavanja srazmeran je koncentraciji prisutnih ukupnih antioksidanasa u uzorku. Koncentracija prisutnih antioksidanasa u uzorku određuje se upotrebom standardne krive. Najčešće upotrebljavani standard za određivanje TAS je Trolox, hidrosolubilni ekvivalent vitamina E.

Reagensi:

Reagens 1: Acetatni pufer (pH = 5,8; 0,4 mol/L). Priprema se mešanjem 940 mL CH₃COONa (0,4mol/L) i 60 mL CH₃COOH (0,4mol/L) za 1000 mL rastvora (prvo se dodaje bazna komponenta, a potom kisela dok se ne postigne potrebna pH vrednost). Rastvor pufera je stabilan šest meseci na temperaturi od +4°C.

Reagens 2: Rastvor ABTS-a [2,2-azobis (3-etilbenzotiazolidin-6-sulfonat)]. Priprema se mešanjem 30 mL acetatnog pufera (pH=3,6; 30 mmol/L), 70 mL rastvora H₂O₂ (2 mmol/L). Potom se 0,549 g čvrstog ABTS-a rastvori u 100 mL prethodno pripremljenog rastvora (finalna koncentracija rastvora ABTS-a je 10 mmol/L). Inkubira se 1 h na sobnoj temperaturi, dok rastvor ne poprimi karakterističnu intenzivnu plavo-zelenu boju ABTS+ jona. Ovako pripremljen reagens je stabilan šest meseci na +4°C.

Reagens 3: Rastvor Troloksa. Kao standard koristi se hidrosolubilni analog vitamina E – *Trolox* (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karboksilna kiselina, Mr=250,29 g/mol). Rastvor Troloxa priprema se rastvaranjem u fosfatnom puferu, pH=7,4; 30 mmol/L.

Postupak određivanja TAS dat je u Tabeli 6. Apsorbancije ispitivanih rastvora očitavane na talasnoj dužini od 660 nm nakon inkubacije od 10 minuta na sobnoj temperaturi. Dobijeni rezultati izražavaju se u *mmol Trolox ekvivalenta po L*. Pri konstruisanju standardne krive korišćeni su rastvori Troloksa rastućih koncentracija i to: 0,125 mmol/L; 0,25 mmol/L; 0,5 mmol/L; 0,75 mmol/L; 1 mmol/L; 1,5 mmol/L; 2 mmol/L.

Tabela 6. Postupak određivanja TAS

	ANALIZA	STANDARDI	SLEPA PROBA
SERUM	12,5 µL	/	/

REAGENS 1	200 µL	200 µL	200 µL
REAGENS 2	37,5 µL	37,5 µL	37,5 µL
RASTVOR STANDARDA	/	12,5 µL	
DEJONIZOVANA VODA	/	/	12,5 µL

Određivanje prooksidativno-antioksidativnog balansa (PAB)

PAB testom se određuje koncentracija vodonik-peroksida (H_2O_2) u antioksidativnom okruženju. Hromogen 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) reaguje i sa vodonik-peroksidom i sa antioksidansima (mokraćnom kiselinom) u isto vreme, s obzirom da se nalaze u istoj sredini. Reakcija H_2O_2 i hromogena je enzimski katalizovana enzimom peroksidazom, pri čemu oksidovanjem TMB-a nastaje intenzivno plavo obojeni proizvod. Za razliku od toga, reakcija mokraćne kiseline i hromogena je nekatalizovana, hemijska reakcija u kojoj se TMB katjon redukuje do bezbojnog proizvoda. Intenziteti obojenja standardnih rastvora su srazmerni odnosu dodatih količina H_2O_2 i mokraćne kiseline. Kapacitet prisutnih antioksidanasa se kalibriše prema mokraćnoj kiselini i izrazava u $\mu\text{mol/L}$ mokraćne kiseline, a kapacitet prooksidanasa se kalibriše prema H_2O_2 i izrazava u $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 . Za pravljenje standardne krive se koriste rastvori H_2O_2 i mokraćne kiseline u različitim odnosima, tako da na početku dominira mokraćna kiselina a na kraju H_2O_2 . Ove dve komponente su izabrane za predstavnike prooksidanasa i antioksidanasa jer ne reaguju jedna sa drugom i ne ometaju aktivnost jedna drugoj prema hromogenu (Alamdari, 2007).

Reagensi:

TMB I rastvor: 60 mg TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin) supstance se rastvori u 10 mL dimetilsulfoksida (DMSO), rastvor se podeli na zapremine od 1,1 mL i čuva na -20°C

TMB katjon: Za pripremu TMB katjona 1 mL TMB/DMSO (TMB I) se doda u 50 mL acetatnog pufera (0,05M, pH 4,5), zatim se doda 175 μL sveže pripremljenog hloramina T ($100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), dobro se promeša i inkubira 1 sat na 37°C , na tamnom mestu uz stalno mešanje. Nakon

inkubacije u 50 mL TMB katjona doda se 25 U enzima peroksidaze. Dobijeni rastvor se pažljivo promeša, podeli u zapremine od 1,1 mL i čuva na -20 °C.

TMB II rastvor: 200 µl TMB/DMSO se rastvori u 10 mL acetatnog pufera (0,05M, pH 5,6). Ovako pripremljen rastvor najbolje je koristiti odmah ili maksimalno u roku od 2 dana, pri čemu se čuva na temperaturi od 4 °C.

Radni rastvor: 1 mL TMB katjona se doda u 10 mL TMB rastvora II i 6 minuta se meša na sobnoj temperaturi i na tamnom mestu. Ovako pripremljen radni rastvor se koristi odmah.

Standardni rastvor: Standardni rastvori se pripremaju mešanjem različitih odnosa (0-100%) 1mmolxL^{-1} H_2O_2 sa 6mmolxL^{-1} mokraćnom kiselinom (rastvorenom u 10 mM NaOH). Priprema standardnih rastvora prikazana je u Tabeli 7.

Tabela 7. Način pripreme standardnog rastvora za PAB test mešanjem mokraćne kiseline i H_2O_2 u različitim odnosima

Standardni rastvor	1	2	3	4	5
Mokraćna kiselina (µl)	100	75	50	25	0
H_2O_2 (µl)	0	25	50	75	100

Metoda je spektrofotometrijska, za očitavanje apsorbancija se koristi ELISA čitač (*Pharmacia* LKB, Wien, Austria). Reakcija se izvodi na ELISA ploči. Na osnovu apsorbancija koje se dobijaju u standardnim rastvorima konstruiše se kalibraciona kriva iz koje se očitavaju koncentracije uzoraka.

Postupak

10 µL svakog uzorka, standardnog rastvora i slepe probe (destilovana voda) se pomeša sa 180µL *radnog rastvora* u svaki od 96 bazena ploče, koja se onda inkubira 12 minuta na 37 °C, na tamnom mestu. Nakon inkubacije reakcija se prekida dodatkom 40µL 2molxL^{-1} hlorovodonične kiseline, pri čemu se dobijena plava boja prevodi u žutu. Apsorbancija se odmah očitava na ELISA čitaču na 450 nm. Vrednosti PAB-a se izražavaju u arbitrarnim jedinicama - HKU (hidrogen-peroksid komplementarne jedinice), koje predstavljaju procenat H_2O_2 u standardnim rastvorima.

Određivanje aktivnosti ekstracelularne SOD

Određivanje aktivnosti ovog enzima u plazmi i homogenatima tkiva se izvodi po originalnoj metodi koju su dali Misra i Fridovich, 1972, uz određene modifikacije. Metoda se zasniva na sposobnosti SOD da inhibira spontanu autooksidaciju adrenalina u baznoj sredini na pH 10,2. Adrenalin je prilično stabilan u kiseloj sredini. Autooksidacija adrenalina je inicirana tragovima teških metala prisutnih kao nečistoće u reagensima. Aktivnost ovog enzima se izražava u relativnim jedinicama, koje se dobijaju merenjem apsorbancije nastalog crvenog proizvoda oksidacije adrenalina na 480 nm, bez prisustva SOD-e (kontrola) i u prisustvu SOD-e (analiza). Aktivnost SOD u uzorku se izračunava kao procenat inhibicije autooksidacije adrenalina.

Reagensi:

Karbonatni pufer, 0,05 mmol/L pH 10,4 , kome je dodat 1 mmol/L EDTA

Hlorovodonična kiselina, 20 mmol/L

Osnovni rastvor adrenalina, 10 mmol/L, rastvoren u 20 mmol/L HCl.

Postupak:

Postupak se uzvodi prema šemi prikazanoj u Tabeli 8. Reakcija počinje dodavanjem adrenalina u reakcionu smešu. Nakon mešanja kivetu ostaviti na tamnom mestu, na 25⁰C, 3 minuta (vreme preinkubacije). Očitavati apsorbanciju na svaki minut u toku naredna 3 minuta. Izračunati $\Delta A/\text{min}$ za kontrolu i analize.

Tabela 8. Postupak određivanja aktivnosti SOD

Pipetirati u kivete (mL):		
	Kontrola	Analiza
Serum	-	0,010
Pufer	0,700	0,690

Adrenalin	0,050	0,050
-----------	-------	-------

Izračunavanje

Relativna jedinica aktivnosti SOD je definisana kao ona aktivnost koja dovodi do 50 % inhibicije autooksidacije adrenalina pod određenim uslovima. Izabrana je ona koncentracija adrenalina koja će u kontroli dati promenu apsorbancije u minuti od 0,025. Pri tome se polazi od koncentracije adrenalina od 10 mmol/L, a zatim se on razblažuje sve dok se ne postigne $\Delta A/\text{min}$ od 0,025. Pod uslovima u kojima smo mi izvodili ovu reakciju bila je potrebna koncentracija adrenalina od 6 mmol/L da bi se postigla odgovarajuća promena apsorbancije. Osnovni rastvor adrenalina je razblaživan sa 20 mmol/L HCl kako bi se postiglo radno razblaženje. S obzirom na definiciju relativne jedinice aktivnosti enzima SOD, jedinična aktivnost bi dovela do 50%-nog smanjenja apsorbancije odnosno $\Delta A/\text{min}$ bi u takvom uzorku bila 0,0125.

Aktivnost SOD u relativnim jedinicama se izračunava preko sledeće proporcije:

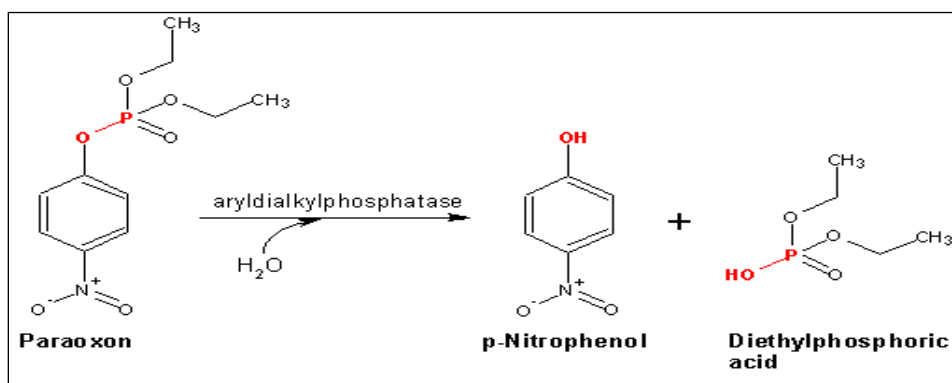
$$0,0125 : 1U = [0,025 - (\Delta A_{\text{analize}}/\text{min})] : X$$

Da bi se dobila aktivnost u 1 mL plazme dobijena vrednost se množi sa razblaženjem uzorka ($V_{\text{uk}} / V_{\text{uz}}$), a zatim sa 1000 da bi se dobila aktivnost u zapremini od 1 L seruma.

$$\text{SOD, U/L} = X \times \frac{V_{\text{uk}}}{V_{\text{uz}}} \times 1000$$

Određivanje paraoksonazne (POazne) aktivnosti prema paraksonu

Određivanje paraoksonazne aktivnosti se zasniva na delovanju PON1 enzima iz seruma na supstrat paraokson (Slika 14), pri čemu dolazi do konverzije paraoksone do p-nitrofenola; brzina te promene se prati kinetički na 405 nm, gde je karakteristični apsorpcioni maksimum za p-nitrofenol koji se u baznoj sredini nalazi u obliku p-nitrofenoksidnog anjona (Richter i Furlong, 1999). Promena aktivnosti se prati u toku tri minuta i računa se promena apsorbancije po minuti. Paraoksonazna aktivnost se određuje na 25°C i na pH=8,5 uz upotrebu 50 mmol/L TRIS-HCl pufera i u prisustvu NaCl (solju stimulisana enzimskom aktivnošću PON1). Paraoksonazna aktivnost PON1 se izražava kao μmol stvorenog p-nitrofenola/min/L ili kao IU/L.



Slika 14. Reakcija koju katalizuje enzim PON1 sa paraoksonom kao supstratom

Reagensi:

Radni pufer: 2 mol/L NaCl, 0,1M Tris-HCl pH 8,5, 2,0 mmol/L CaCl₂

Diluent pufer: 10 mmol/L Tris-HCl, pH 8,5, 2 mmol/L CaCl₂

Zasićen rastvor NaOH

Paraokson supstrat, 1,2 mmol/L

Postupak:

Za određivanje POazne aktivnosti serum se razblažuje diluent puferom u odnosu 1:10. 4 µL seruma pomeša se sa 400 µL rastvora paraoksona i meri se promena apsorbancije na 405 nm u toku 3 minuta. POazna aktivnost se izražava kao µmol stvorenog p-nitrofenola/min/L ili jednostavnije kao IU/L.

Izolacija LDL i HDL frakcije

Reagensi:

Reagens za precipitaciju HDL

Reagens za precipitaciju LDL (Biosystem Chol-LDL kit)

0,01% Triton X100 u 50 g/L NaCl

Postupak:

Frakcija HDL holesterola se izdvaja iz seruma nakon precipitacije VLDL i LDL holesterola reagensom za precipitaciju, dok u supernatantu ostaje HDL-C. Dodaje se 0,5 mL reagensu u 0,2 mL uzorka, vorteksira i inkubira tokom 10 min na sobnoj temperaturi. Zatim se vrši centrifugiranje uzorka na 4000 rpm tokom 10 min. Supernatant se pažljivo uklanja.

Precipitacija LDL holesterola se vrši na sledeci način: u 0,2 mL seruma doda se 0,2 mL reagensu za precipitaciju, vorteksira se i inkubira 30 min u frižideru, a zatim centrifugira tokom 5 min na 4000 rpm (Guerci i sar, 1999). Supernatant se odbacuje, a precipitat se rastvara u 0,5 mL 0,1% rastvora Tritona X-100 u 50 g/l NaCl vorteksiranjem (Moss i sar, 1986). Iz ove frakcije se vrši TAS, TOS, MDA, a ona se koristi i za egzogenu oksidaciju.

Egzogena oksidacija izolovane LDL frakcije

Reagensi:

1 mM EDTA

100 μ M Cu^{2+} u PBS-a pH 7,4 (*ex tempore*)

Postupak:

Postupak je izveden u skladu sa prethodno razvijenom metodom Scocia i sar, 2005. U 100 μ L izolovane LDL frakcije se doda 50 μ L rastvora 100 μ M Cu^{2+} i 25 μ L 30% rastvora H_2O_2 . Slepa proba sadži 100 μ L rastvora Tritona umesto LDL frakcije. Inkubacija se vrši tokom 2,5h na 37°C, dok se lipidna peroksidacija se zaustavlja dodatkom 30 μ L 1mM EDTA uz hlađenje na ledu. U ovoj frakciji su određeni MDA, TOS i TAS, kao i mobilnost čestica na elektroforezi.

Elektroforeza lipoproteina na agarozu gelu – određivanje udela oksidovanih LDL čestica

Reagensi:

1% rastvor agaroze u tris-barbituratnom puferu, pH 8,60: za 500mL: 11,2 g Na-dietil barbituratna kiselina, 22,15 g Tris-hidroksimetil-aminometana, 0,266 g Ca-laktata, 0,325 g Na-azida

Pufer za elektroforezu: 50mM barbituratni pufer, pH 8,60: za 2L: 17,7 g Na-barbiturata, 2,6 g barbituratne kiseline, 1 g NaCl, 0,7 g Na₂ EDTA

1% rastvor bromfenol plavog

Rastvor za fiksiranje: 60% etanola, 10% acetatne kiseline

Rastvor za bojenje- Fat Red

Rastvor za odbojavanje: 60% etanola

Postupak:

Gel za izvođenje elektroforeze se dobija zagrevanjem rastvora agaroze u vodenom kupatilu (do 60° C), a zatim izlivanjem rastvora na staklenu ploču. Zatim se vrši postavka češljica na gel, kako bi se stvorila mesta za nanošenje uzoraka. Priprema uzoraka za elektroforezu se vrši mešanjem 40 µL uzorka i 10 µL boje bromfenol plavo vorteksiranjem (koriste se uzorci LDL frakcije i egzogeno oksidovane LDL frakcije). Gel se prenese u kadicu za elektroforezu, a zatim se doda i pufer za elektroforezu. Oko 10 µL obojenih uzorka nanosi se na gel, pri čemu se neoksidovana i oksidovana LDL frakcija iste osobe nanose jedan pokraj druge. Elektroforeza se izvodi pod sledecim uskovima: 200 V, 36,5 mA, 7W tokom 20 minuta. Nakon završetka elektroforeze, gel se postavlja u rastvor za fiksiranje i blago meša tokom 10 minuta. Zatim se gel prekriva filter papirom i nekoliko slojeva papirne vate, kako bi se pokupio višak sredstva za fiksiranje. Preko gela, filter papira i papirne vate stavlja se čvrst predmet, kako bi se izvršilo istiskivanje rastvora za fiksiranje i istanjivanje gela. Nakon toga se vrši sušenje gela u sušnici tokom 20 min na 60° C. Nakon sušenja, gel se prebacuje u kadicu sa bojom i ostavi da stoji preko noći. Odbojavanje se vrši u periodu od 30 min do 1 h.

Nakon odbojavanja, pristupa se merenju dužina traka na agarozu gelu za svaki uzorak i određuje se indeks REM (eng. *Relative electrophoretic mobility*, relativna migraciona daljina), koji predstavlja odnos dužina traka koje odgovaraju oksidovanoj i neoksidovanoj frakciji istog uzorka, respektivno.

3.4 Upitnici

3.4.1 Procena pojave, dužine trajanja infekcija gornjeg respiratornog trakta i subjektivnog osećaja težine respiratornih simptoma

Procena simptoma infekcija gornjeg respiratornog trakta je vršena na dnevnom nivou telefonskim putem. U tu svrhu je korišćena srpska verzija validiranog upitnika WURSS-21® (eng. *Wisconsin Upper Respiratory Symptom Survey*) (Barrett i sar., 2002). Upitnik predstavlja niz od 10 navedenih simptoma (curenje nosa, zapašenost nosa, kijanje, grlobolja, grebanje grla, kašalj, promuklost, pritisak u glavi, pritisak u grudima, umor), čiji se subjektivni osećaj težine ocenjuje Likertovom skalom od 8 gradacijskih stupnjeva (0 predstavlja odsustvo simptoma, dok 7 označava prisustvo teorijski najintenzivnijeg osećaja simptoma). Subjektivni osećaj težine simptoma je računat množenjem ukupnog broja dana trajanja simptoma sa subjektivnom ocenom njegove težine, dok je ukupni subjektivni osećaj epizode respiratorne infekcije dobijen sabiranjem pojedinačnih skorova subjektivnog osećaja težine simptoma (Gleeson i sar. 2011). Epizodom respiratorne infekcije je smatrano prisustvo ukupnog skora subjektivnog osećaja težine simptoma >24 (Gleeson i sar., 2011).

Pored toga, na sličan način je beleženo i prisustvo gastro-intestinalnih simptoma (mučnina, povraćanje, dijareja, abdominalni bol, abdominalna nadutost, nadimanje, kraćanje stomaka i gubitak apetita), dok je njihov subjektivni osećaj težine ocenjivan takođe Likertovom skalom od 8 gradacijskih stupnjeva (West i sar. 2011).

Sportistima nije bilo zabranjeno da koriste lekove bez recepta i preparate za olakšanje simptoma, ali je njihovo korišćenje detaljno beleženo.

3.4.2 Upitnik o stanju raspoloženja

Srpska verzija validiranog upitnika o stanju raspoloženja - *Profile of Mood States questionnaire* (POMS) predstavlja psihološki upitnik, koji se sastoji od niza 65 osećanja i stanja raspoloženja, koja opisuju trenutak popunjavanja upitnika (McNair i sar. 1971). Ispitanici ocenjuju svaku stavku upitnika na Likertovoj skali od 5 gradacijskih stupnjeva (0 predstavlja odsustvo osećanja ili raspoloženja, dok 4 označava prisustvo teorijski najintenzivnijeg osećaja ili raspoloženja). Bodovanjem odgovara ispitanika, računaju se spojedinačni skorovi koji opisuju stanje anksioznosti, depresije, borbenosti, konfuznosti, snage, zamora, kao i totalnog osećaja uznemirenosti. Ispitanici su upitnik popunjavali 2 puta: pre i nakon studije, i to 10 minuta pre izvođenja ergospirometrijskog testa.

3.4.3 Merenje intenziteta treniranja

Sportisti su na nedeljnom nivou popunjavali upitnik o intenzitetu fizičke aktivnosti - *International Physical Activity Questionnaire* (IPAQ; <http://www.ipaq.ki.se/downloads.htm>). Na osnovu popunjenih upitnika, kao i kompendijuma fizičke aktivnosti (Ainsworth i sar. 2011), računat je intenzitet fizičke aktivnosti u jednicima MET (engl. *metabolic unit*) -čas na nedeljnom nivou. Pored toga, sportisti su tokom respiratorne infekcije ocenjivali uticaj bolesti na treniranje takođe pomoću Likertove skale od 8 stupnjeva.

3.5 Statistička analiza

Obrada podataka izvršena je SPSS softverom (SPSS v. 20.0; SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Normalnost podataka je najpre proverena *Shapiro-Wilk* testom. Podaci su prikazani kao srednja vrednost i standardna greška, ukoliko je raspodela ispitivanih podataka sledila normalni tok. Ukoliko distribucija podataka nije sledila normalni tok, proveravana je distribucija logaritmovanih vrednosti, a rezultati su prikazani kao medijana i 95 % interval pouzdanosti.

Kontinuirane varijable koje slede normalnu raspodelu, kao i kontinuirane varijable koje posle logaritmovanja slede normalnu raspodelu, poređene su Studentovim t-testom. Varijable koje ne prate normalnu raspodelu poređene su neparametarskim testom parova. Za analiziranje više grupa parametarskih podataka korišćena je jednofaktorska i dvofaktorska analiza varijanse (ANOVA) sa ponavljanjem, sa *Bonferoni post hoc* testom. Razlike između kategoričkih podataka su testirane su upotrebom χ^2 testa. Za ispitivanje korelacije između različitih parametara koji su određivani u studiji, korišćena je Spearmanova neparametarska ili Pearsonova korelaciona analiza. Minimalni uslov za postojanje statistički značajne razlike je p (nivo značajnosti) manji ili jednak 0,05.

Statističkom analizom *a priori*, izračunato je da je za smanjenje trajanja dužine epizode respiratorne infekcije za 30% (Haywood i sar, 2014) pri $\alpha=0,05$ i $\beta=0,8$, potrebno uključiti ukupno 38 ispitanika.

4 Rezultati

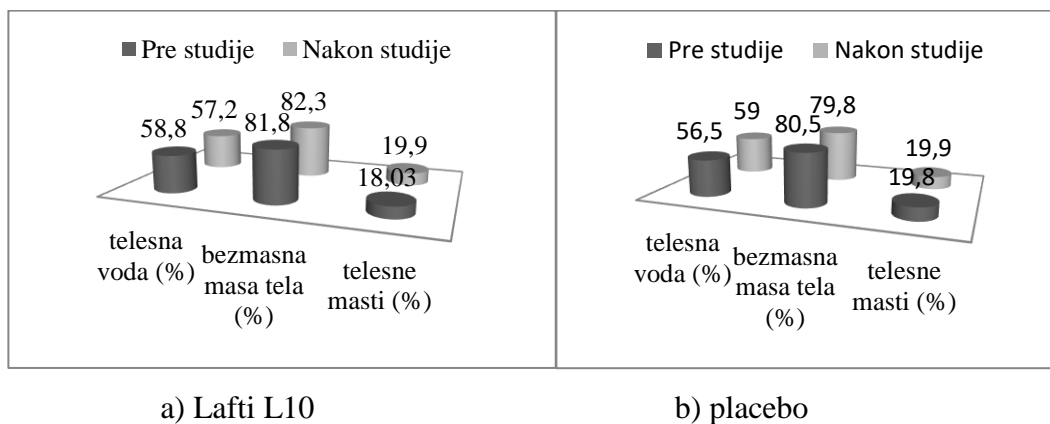
4.1 Profil sportista

Fizički i antropometrijski parametri učesnika se nisu značajno razlikovale među grupama (Tabela 9), kako na početku, tako ni na kraju studije. Telesna kompozicija sportista se nije promenila ni u jednoj grupi tokom studije. Posebne vrednosti za muškarce i devojke su date na Slikama 15 i 16.

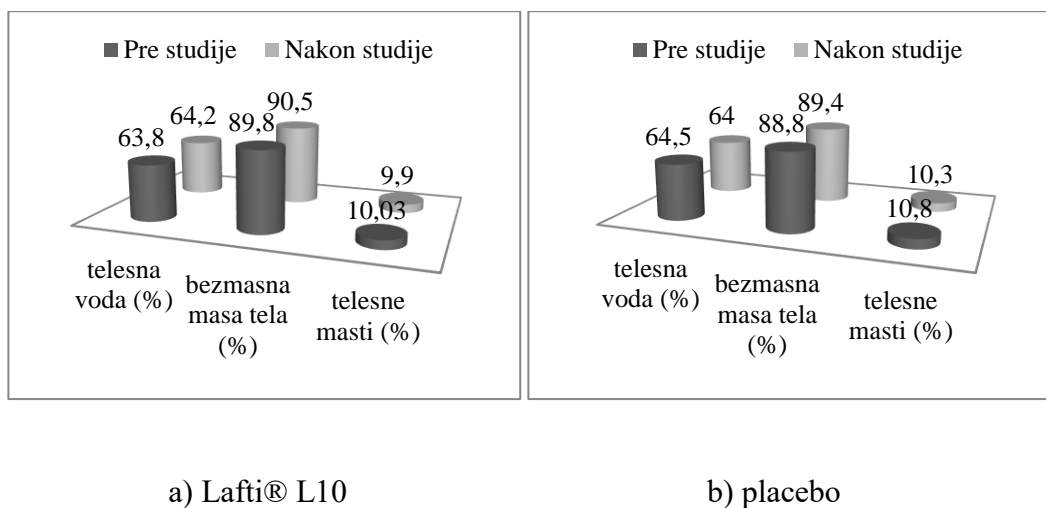
Tabela 9. Fizičke i antropometrijske karakteristike ispitanika

	Lafti L10®	Placebo	p vrednost
Broj učesnika	20	19	
Muškarci/žene	15/5	14/5	
Starost (godine)	24±2.7	23±2.5	0.86
VO ₂ max (mL/min/kg)	56±9.3	57±10	0.79
Intenzitet treniranja (MET-h nedeljno)	99±55	100±57	0.98
Telesna težina (kg)	74±11	74±11	0.97
Telesna visina (cm)	180±10	180±8	0.95
BMI (kg/m ²)	23±2.2	23±2.4	0.95

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija



Slika 15. Telesna kompozicija devojaka pre i nakon studije u: a) Lafti® L10 b) placebo grupi



Slika 16. Telesna kompozicija muškaraca pre i nakon studije u: a) Lafti® L10 b) placebo grupi

Nije utvrđena statistički značajna razlika u intenzitetu FA među grupama (Tabela 9). Takođe, analiza trodnevnog dnevnika ishrane je ukazala da je unos makro- i mikronutrijenata sportista bio sličan u obe grupe (Tabela 10, Slika 17), pa se na osnovu datih podataka može zaključiti da je grupa ispitivanih sportista bila homogena.

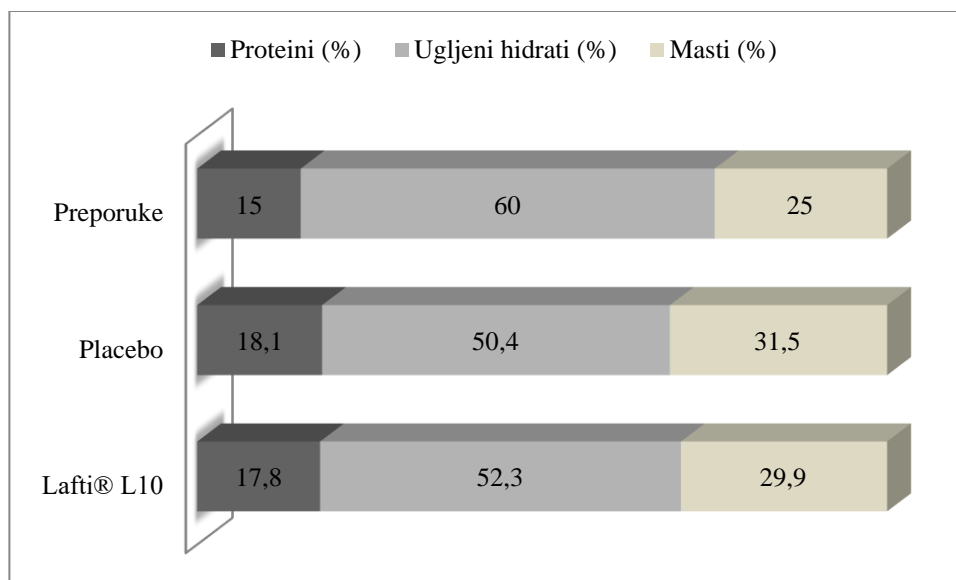
Nutritivna analiza dnevnika ishrane sportista ukazala je na određena odstupanja od principa racionalne ishrane u obe grupe ispitanika. Naime, utvrđeno je da je unos proteina veći od preporučenih vrednosti SZO, dok je dijetarni unos masti na gornjoj granici preporučenih vrednosti. Naprotiv, unos ugljenih hidrata je bio manji od preporučenih vrednosti, jer nije zadovoljena preporuka od 55-60% ukupnog energetskeg unosa. Takođe, unos skoro svih mikronutrijenata bio je manji od preporučenih vrednosti.

Tabela 10. Prosečan unos mikro- i makronutrijenata ispitanika tokom studije

<i>Nutrijent</i>	<i>Lafti® L10</i>	<i>Placebo</i>	<i>p</i>	<i>DRI</i>
Energetski unos (kcal)	2076±988	2029±636	0,91	
Proteini (g)	92±33	99±33	0,68	12-15%
Ugljeni hidrati (g)	255±144	233±80	0,71	55-65%
Lipidi (g)	69±32	71±25	0,85	20-30%
Holesterol (mg)	372±149	341±91	0,46	do 500
Zasićene masne kiseline (g)	25±12	22±11	0,67	10%
Mononezasićene masne kiseline (g)	22±11	22±10	0,93	10%
Polinezasićene masne kiseline (g)	13±5	16±4	0,24	10%
Dijetna vlakna (g)	16±10	15±7	0,89	25-30
Vitamin A (µg)	1545±1777	1562±2550	0,41	900
Vitamin C (mg)	70±26	77±55	0,77	90
Vitamin D (µg)	1,1±0,80	2,2±1,7	0,15	
Vitamin E (mg)	9,8±2,2	10±5,2	0,12	15
Hrom (µg)	30±19	35±25	0,67	35
Bakar (mg)	1,3±0,52	1,0±0,37	0,78	
Selen (µg)	50±56	55±34	0,66	55
Cink (mg)	10±3,2	9,7±6,1	0,84	11

Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost±SD

DRI – dijetarni referentni unos (eng. *Dietary Reference Intake*)



Slika 17. Zastupljenost makronutrijenata u ishrani sportista Lafti® L10 i placebo grupe

Komplijansa ispitanika

Ispitanici su na završno testiranje doneli kapsule probiotika/placebo koje su preostale nakon suplementacije. Nakon prebrojavanja preostalih kapsula, u probiotskoj, tj. placebo grupi utvrđena je komplijansa od 95%, odnosno 94%. Drugim rečima, statistička analiza nije ukazala na značajnu razliku među grupama u komplijansi ($p=0,74$).

4.2 Procena respiratornih i GIT simptoma

Suprotno prvobitno postavljenoj hipotezi, nije došlo do smanjenja pojave respiratornih infekcija u probiotskoj grupi (Tabela 11). Ipak, zabeležen je trend smanjenja težine respiratornih simptoma ($p=0,078$). Međutim, suplementacija probiotikom Lafti je skratila trajanje respiratorne infekcija za oko 3 dana ($7,3\pm 2,9$ nasuprot $10\pm 4,7$ dana, $p=0,047$). Takođe, u probiotskoj grupi je zabeležen manji broj respiratornih simptoma. Razlika između grupa u broju suplemenata/lekova bez recepta, kao i u dužini njihovog korišćenja nije primećena. Broj zabeleženih GIT infekcija je bio isuviše nizak za vršenje statističke analize i donošenje odgovarajućih zaključaka.

Tabela 11. Efekat suplementacije sojem *L. helveticus* L10 na respiratorne infekcije

	<i>Lafti</i> ® L10	Placebo	<i>p</i>
Proporcija sportista koji su prijavili URTI epizodu	12/20	11/19	0.897
Trajanje URTI epizode (dani)	7,3±2,9	10±4,7*	0,047
Ozbijnost URTI simptoma	111±96	129±40	0,078
Broj simptoma po epizodi	4,9±1,9	6,9±1,2*	0,035
Broj suplemenata/lekova po URTI epizodi	1,2±1,1	1,9±0,94	0,101
Broj dana korišćenja suplemenata/lekova po epizodi	3,7±4,3	7,6±5,8	0,166
Ukupan broj dana trajanja URTI	88	132*	0,000563

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD

*značajna razlika među grupama ($p < 0,05$)

4.3 Uticaj suplementacije sojem *L. helveticus* L10 na mukozni, humoralni i celularni imunitet

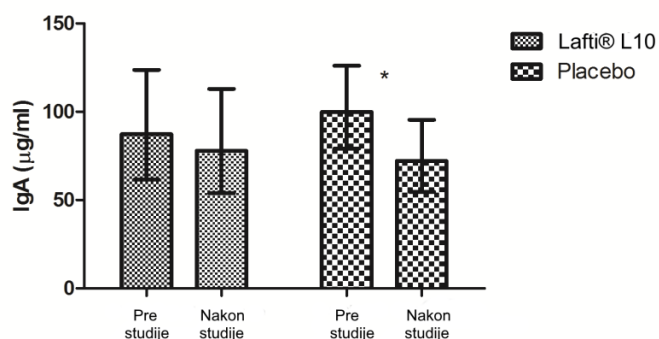
4.3.1 Uticaj suplementacije sojem *L. helveticus* L10 na mukozni imunitet

U svrhu ispitivanja uticaja probiotske suplementacije na mukozni imunitet, određivani su: apsolutna koncentracije sIgA, brzina sekrecije sIgA i salivarni protok. Pored toga, praćena je i koncentracija ukupnih proteina u salivi. Statistička analiza rezultata je podrazumevala primenu neuparenog t testa za srednju razliku promena svake grupe tokom studije.

Salivarni protok (-9,2%, -99 - 76%, srednja razlika među grupama, 90% interval pouzdanosti; $p=0.80$), brzina sekrecije sIgA (3,5%, -25 - 34%, $p=0,65$) i koncentracija ukupnih proteina u salivi (1,5%, -4,7 - 10%, $p=0,85$) se nisu menjali tokom studije, kako u suplementiranoj, tako i u kontrolnoj grupi. Rezultati su prikazani u Tabeli 12.

Zabeležena je značajna razlika između grupa (35%, -1,4, - 53%; $p=0,03$) za nivo sIgA antitela. Uočen je značajan pad nivoa sIgA u placebo grupi (-28%, -38, -20%, srednja vrednost,

90% interval pouzdanosti; $p=0,02$), dok je u suplementiranoj grupi takođe zabeležen pad, ali koji nije dostigao statističku značajnost (-8,7%, -15, 1,7%, $p=0,34$). Rezultati su prikazani na Slici 18.



Slika 18. Koncentracija sIgA pre studije i nakon studije u suplementiranoj i kontrolnoj grupi.

* značajna razlika u odnosu na početak studije

Tabela 12. Parametri mukoznog imuniteta na početku i kraju studije

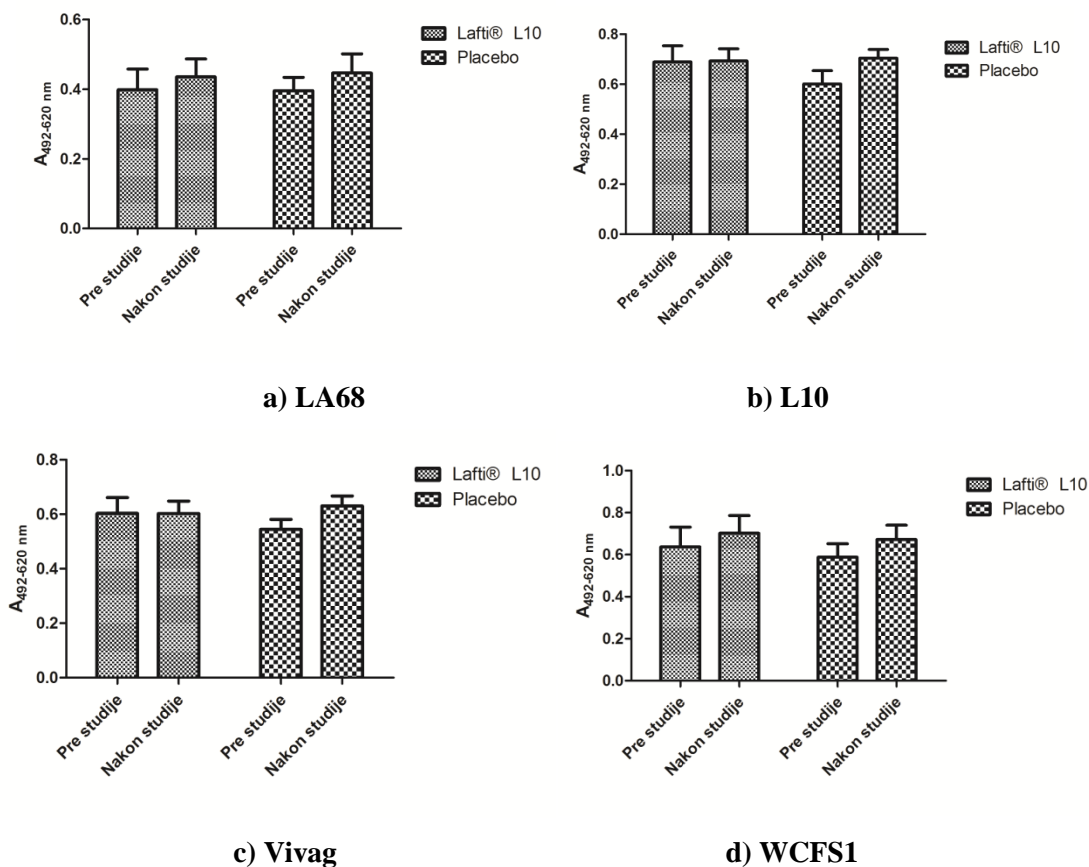
	<i>Lafti® L10</i>		<i>Placebo</i>	
	<i>Pre studije</i>	<i>Nakon studije</i>	<i>Pre studije</i>	<i>Nakon studije</i>
Salivarni protok (µL/min)	595±159	767±464	585±220	682±556
Brzina sekrecije sIgA (µg/min)	56±27	69±34	61±25	67±24
Koncentracija proteina (g/L)	2,3±0,25	2,3±0,24	2,5±0,35	2,4±0,34

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD

Nivo specifičnih IgA antitela u salivi

Suplementacija sojem *L. helveticus* L10 nije dovela do značajnih promena u nivou specifičnih IgA antitela u salivi. Pored toga, nije utvrđena korelacija među nivoima specifičnih antitela protiv različitih LAB, kao ni sa nivoom ukupnog IgA antitela u salivi.

Rezultati specifičnih IgA antitela protiv LAB su prikazani na Slici 19.



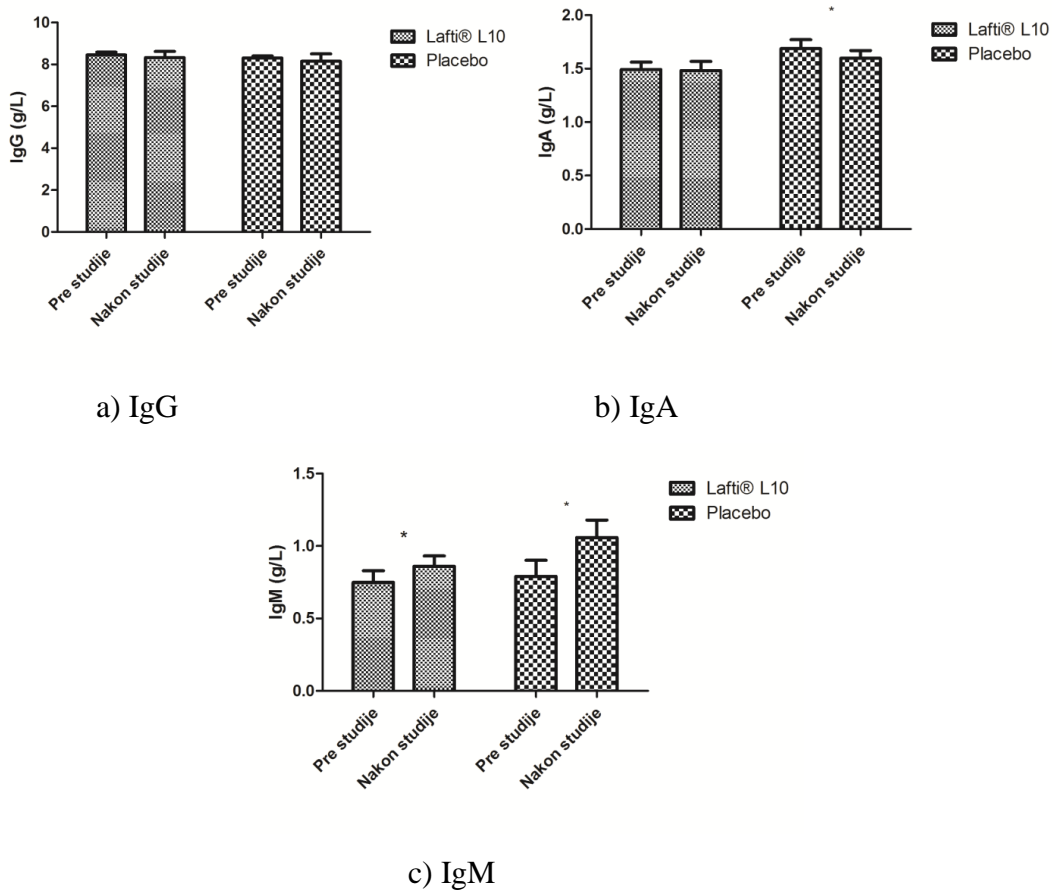
Slika 19. Nivo specifičnih IgA antitela u salivi protiv: a) *L. rhamnosus* LA68 b) *L. helveticus* L10 c) *L. acidophilus* Vivag d) *L. plantarum* WCFS1

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD

4.3.2 Uticaj soja *L. helveticus* L10 na humoralni imunitet

Nivo ukupnih IgG, IgA i IgM antitela u serumu

Suplementacija *L. helveticus* L10 nije dovela do značajnih promena među grupama, kako u nivou ukupnih IgG antitela: (srednja razlika među grupama: 0,09%, -10 – 5,0%, $p=0,99$), tako ni u nivou ukupnih IgM antitela (srednja razlika među grupama: -27%, -68 – (-15%), $p=0,14$) u serumu. Sa druge strane, zabeležen je značajan porast IgM antitela u obe grupe: u eksperimentalnoj (18% (15 - 20%), $p=0,02$) i u placebo grupi (35%, 22 - 47%, $p=0,02$). Suplementacija probiotikom je dovela do održanja nivoa ukupnih IgA antitela (srednja razlika među grupama: 15% (12 - 18%, $p=0,04$)), s obzirom na to da tokom studije nije zabeležena značajna razlika u eksperimentalnoj grupi (0,48%, -0,45 - 1,4%, $p=0,77$), dok je u placebo grupi zabeležen pad (-8%, -10 – (-2,2%), $p=0,03$) (Slika 20).



Slika 20. Nivo ukupnih a) IgG b) IgA c) IgM antitela u serumu na početku i kraju studije u Lafti® L10 i placebo grupi * značajna razlika u odnosu na početak studije

Analiza specifičnih IgG antitela

Specifična IgG antitela protiv LAB bakterija i uropatogenih bakterija su prikazani u Tabeli 13. Statistička analiza nije pokazala značajnu razliku u nivo specifičnih antitela protiv LAB bakterija, ali je uočen značajni pad od 16% (-2,8 - 35%, $p=0,04$) u nivou anti - *Enterococcus faecalis* IgG antitela.

Tabela 13. Nivo specifičnih IgG antitela na početku i kraju studije

	<i>Lafti® L10</i>		<i>Placebo</i>		p
	Pre studije	Nakon studije	Pre studije	Nakon studije	
<i>L. plantarum</i> WCSFS1	0,40±0,24	0,51±0,27	0,61±0,31	0,71±0,37	0,35
<i>L. rhamnosus</i> LB64	0,42±0,29	0,43±0,24	0,39±0,29	0,49±0,37	0,09
<i>L. rhamnosus</i> LA68	0,24±0,25	0,27±0,25	0,27±0,32	0,31±0,28	0,35
<i>L. helvetus</i> Lafti L10	0,45±0,27	0,56±0,20	0,52±0,35	0,61±0,36	0,41
<i>E. coli</i>	0,21±0,23	0,17±0,17	0,13±0,09	0,14±0,09	0,09
<i>P. mirabilis</i>	0,50±0,48	0,51±0,51	0,41±0,34	0,38±0,32	0,21
<i>E. faecalis</i>	0,23±0,12	0,21±0,13	0,32±0,23	0,29±0,20	0,04

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost apsorbancije \pm SD u okviru grupe. P vrednost se odnosi na razliku u promenama vrednosti tokom studije među grupama

Nivo specifičnih IgM tela

Tokom studije nije došlo do promena specifičnih IgM antitela, kako protiv LAB, tako ni protiv uropatogenih bakterija. Nivoi specifičnih IgM antitela protiv LAB bakterija i uropatogenih bakterija su prikazani u Tabeli 14.

Tabela 14. Specifična IgM antitela

	<i>Lafti® L10</i>		<i>Placebo</i>		p
	Pre studije	Nakon studije	Pre studije	Nakon studije	
<i>L. plantarum</i> WCSFS1	0,54±0,22	0,49±0,20	0,58±0,26	0,56±0,26	0,41
<i>L. rhamnosus</i> LB64	0,29±0,12	0,28±0,13	0,34±0,20	0,33±0,16	0,42
<i>L. rhamnosus</i> LA68	0,29±0,12	0,26±0,14	0,33±0,21	0,30±0,16	0,40
<i>L. helvetus</i> Lafti L10	0,43±0,13	0,39±0,17	0,50±0,29	0,48±0,27	0,26
<i>E. coli</i>	0,29±0,14	0,25±0,12	0,31±0,18	0,31±0,16	0,46
<i>P. mirabilis</i>	0,46±0,16	0,46±0,12	0,55±0,27	0,54±0,28	0,97
<i>E. faecalis</i>	0,49±0,16	0,44±0,12	0,56±0,30	0,54±0,29	0,91

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost apsorbancije ± SD u okviru grupe. P vrednost se odnosi na razliku u promenama vrednosti tokom studije među grupama

Analiza specifičnih IgA antitela u serumu

Nivoi određenih specifičnih IgA antitela se nisu značajno menjali tokom studije u Lafti® L10 grupi. Međutim, uočen je značajan pad specifičnih IgA antitela protiv *L. rhamnosus* LA68 i *L. rhamnosus* LB64 u odnosu na probiotsku grupu. Sa druge strane, nisu zabeležene značajne razlike tokom studije za uropatogene sojeve među grupama (Tabela 15).

Tabela 15. Nivo specifičnih IgA antitela u serumu

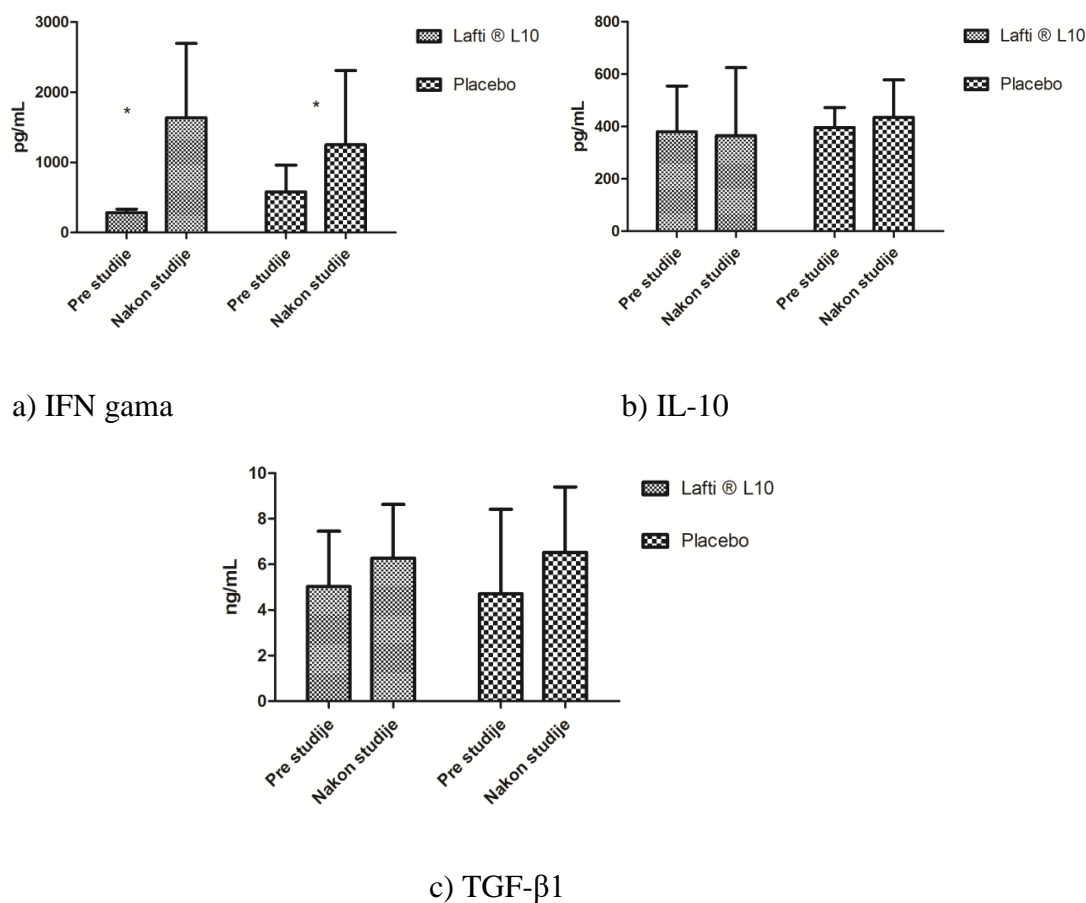
	<i>Lafti® L10</i>		<i>Placebo</i>		p
	Pre studije	Nakon studije	Pre studije	Nakon studije	
<i>L. plantarum</i> WCSFS1	0,16±0,09	0,15±0,09	0,17±0,07	0,15±0,06	0,47
<i>L. rhamnosus</i> LB64	0,12±0,05	0,11±0,05	0,17±0,11	0,14±0,09	0,02
<i>L. rhamnosus</i> LA68	0,09±0,06	0,08±0,05	0,11±0,07	0,08±0,07	0,02
<i>L. helvetus</i> Lafti L10	0,21±0,08	0,18±0,08	0,21±0,06	0,18±0,06	0,98
<i>E. coli</i>	0,12±0,11	0,09±0,09	0,08±0,04	0,07±0,04	0,33
<i>P. mirabilis</i>	0,14±0,08	0,14±0,08	0,14±0,05	0,13±0,05	0,95
<i>E. faecalis</i>	0,16±0,07	0,15±0,08	0,19±0,10	0,17±0,08	0,73

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± SD. P vrednost se odnosi na razliku u promenama vrednosti tokom studije među grupama

4.3.3 Uticaj suplementacije na celularni imunitet

Odgovor citokina

Nivoi IL-10 i IFN- γ određeni nakon stimulacije PBMC antigenima (ConA, PGN, LPS Lafti®) poređeni su jednofaktorskom analizom varijanse (ANOVA), što je ukazalo na to da je optimalna stimulacija IL-10, tj. IFN- γ , postignuta upotrebom PGN, tj. ConA, respektivno. Stoga, jedino su ti rezultati i prezentovani. Rezultati su prikazani na Slici 21.



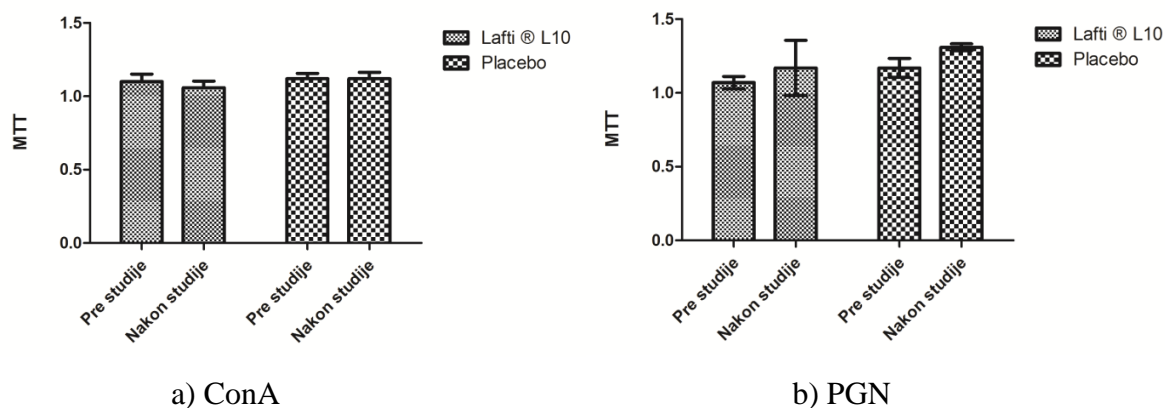
Slika 21. Nivo citokina na početku i kraju studije: a) ConA stimulisan IFN- γ b) PGN-stimulisan IL-10 c) TGF- β 1

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD (TGF- β 1) ili medijana (95% interval pouzdanosti). *Razlika između vrednosti na početku i kraju studije: probiotska grupa ($p=0,011$), placebo grupa ($p=0,025$); razlika vrednosti među grupama pre studije ($p=0,005$) i nakon studije ($p=0,09$)

Uočen je značajan porast nivoa IFN- γ u obe grupe ispitanika (značajan efekat interakcije $F(1,37) = 62,99$, $p = 0,003$, $\eta^2 = 0,471$ i efekat vremena $F(1,37) = 22,35$, $p < 0,001$, $\eta^2 = 0,818$) nakon stimulacije PBMC antegenom ConA, pri čemu *post hoc* test nije ukazao na razliku među grupama. Sa druge strane, nisu zabeležene značajne promene nivoa IL-10 ni u jednoj od grupa nakon suplementacije. Pokazan je značajan efekat vremena na nivo TGF- β 1: $F(1,37) = 6,14$, $p = 0,030$, $\eta^2 = 0,178$), ali *post hoc* test nije potvrdio značajnu razliku ni za probiotsku ($p = 0,22$), ni za placebo grupu ($p = 0,06$). Nivo IL-4 bio je ispod nivoa detekcije u svim uzorima, kako na početku, tako i na kraju studije.

MTT test

Statistička analiza nije ukazala na značajne promene vijabilnosti ćelija nakon stimulacije antigenima ConA ili LPS tokom studije ni u jednoj grupi. Na Slici 22 su rezultati MTT testa prikazani kao koeficijent proliferacije, koji predstavlja odnos apsorbancije uzorka koji je stimulisan antigenom (ConA i PGN) i apsorbancije uzorka koji nije stimulisan.



Slika 22. Rezultati MTT testa na početku i kraju studije nakon stimulacije: a) antigenom ConA b) antigenom PGN

Udeo leukocitnih populacija

Suplementacija probiotikom nije značajno uticala na koncentraciju leukocitnih i limfocitnih populacija (CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD4+CD45RO+, CD8+CD45RO+, CD19+ i CD11b+ ćelije) (Tabela 16). Primećen je značajan efekat grupe za CD3-CD56+ ćelije, bez značajnih efekata vremena i interakcije. Razlika među grupama bila je značajna na početku studije ($p=0,041$), ali ne i na kraju suplementacije ($p=0,082$). Sa druge strane, uočen je značajni efekat interakcije, vremena i grupe za odnos CD4+/CD8+ ćelija. *Post hoc* test je pokazao da razlika među grupama nije bila značajna pre početka suplementacije ($p=0,775$), ali je značajnost dostignuta nakon studije ($p=0,02$). Pored toga, značajan porast odnosa CD4+/CD8+ ćelija tokom perioda suplementacije uočen je jedino u Lafti® L10 grupi ($p<0,001$).

Tabela 16. Udeo leukocitnih i limfocitnih populacija tokom studije

		<i>Vreme</i>																																																																																																															
		Pre studije	<i>Nakon studije</i>	Efekat interakcije (p, η^2)	Efekat vremena (p, η^2)	Efekat tretmana (p, η^2)																																																																																																											
Limfociti (x10 ⁹ /L ćelija)	Lafti ® L10	1,96±0,59	2,35±1,24	0,849, 0,003	0,147, 0,144	0,504, 0,033																																																																																																											
	placebo	2,13±0,70	2,64±0,87				Monociti (x10 ⁹ /L ćelija)	Lafti ® L10	0,40±0,12	0,52±0,49	0,434, 0,044	0,615, 0,019	0,712, 0,010		placebo	0,40±0,12	0,43±0,17	Granulociti (x10 ⁹ /L ćelija)	Lafti ® L10	4,42±1,04	4,31±1,61	0,420, 0,047	0,226, 0,103	0,352, 0,062		placebo	4,37±1,96	4,60±1,91	CD3+CD4+ (x10 ⁹ /L ćelija)	Lafti ® L10	0,82±0,32	0,89±0,26	0,330, 0,073	0,679, 0,014	0,073, 0,227		placebo	0,77±0,12	0,89±0,40	CD3+CD8+ (x10 ⁹ /L ćelija)	Lafti ® L10	0,63±0,34	0,46±0,07	0,711, 0,012	0,100, 0,209	0,296, 0,090		placebo	0,58±0,13	0,70±0,21	CD3-CD56+ (x10 ⁹ /L ćelija)	Lafti ® L10	0,16±0,09	0,12±0,07	0,198, 0,124	0,520, 0,033	0,006*, 0,449		placebo	0,24±0,20	0,13±0,14	CD4+CD45RO+ (x10 ⁹ /L ćelija)	Lafti ® L10	0,43±0,30	0,39±0,27	0,785, 0,006	0,535, 0,030	0,394, 0,056		placebo	0,44±0,09	0,52±0,19	CD8+CD45RO+ (x10 ⁹ /L ćelija)	Lafti ® L10	0,12±0,07	0,13±0,09	0,745, 0,008	0,811, 0,005	0,396, 0,056		placebo	0,15±0,10	0,17±0,14	CD19+ (x10 ⁹ /L ćelija)	Lafti ® L10	0,18±0,07	0,21±0,17	0,214, 0,116	0,550, 0,028	0,420, 0,051		placebo	0,19±0,04	0,28±0,14	CD11b+ (x10 ⁹ /L ćelija)	Lafti ® L10	3,81±1,52	2,96±1,17	0,764, 0,007	0,230, 0,101	0,140, 0,149		placebo	4,00±1,59	4,52±1,88	CD4+/CD8+	Lafti ® L10	1,30±0,04	1,41±0,07	0,001†, 0,489	0,001†, 0,462	0,020†, 0,350	
Monociti (x10 ⁹ /L ćelija)	Lafti ® L10	0,40±0,12	0,52±0,49	0,434, 0,044	0,615, 0,019	0,712, 0,010																																																																																																											
	placebo	0,40±0,12	0,43±0,17				Granulociti (x10 ⁹ /L ćelija)	Lafti ® L10	4,42±1,04	4,31±1,61	0,420, 0,047	0,226, 0,103	0,352, 0,062		placebo	4,37±1,96	4,60±1,91	CD3+CD4+ (x10 ⁹ /L ćelija)	Lafti ® L10	0,82±0,32	0,89±0,26	0,330, 0,073	0,679, 0,014	0,073, 0,227		placebo	0,77±0,12	0,89±0,40	CD3+CD8+ (x10 ⁹ /L ćelija)	Lafti ® L10	0,63±0,34	0,46±0,07	0,711, 0,012	0,100, 0,209	0,296, 0,090		placebo	0,58±0,13	0,70±0,21	CD3-CD56+ (x10 ⁹ /L ćelija)	Lafti ® L10	0,16±0,09	0,12±0,07	0,198, 0,124	0,520, 0,033	0,006*, 0,449		placebo	0,24±0,20	0,13±0,14	CD4+CD45RO+ (x10 ⁹ /L ćelija)	Lafti ® L10	0,43±0,30	0,39±0,27	0,785, 0,006	0,535, 0,030	0,394, 0,056		placebo	0,44±0,09	0,52±0,19	CD8+CD45RO+ (x10 ⁹ /L ćelija)	Lafti ® L10	0,12±0,07	0,13±0,09	0,745, 0,008	0,811, 0,005	0,396, 0,056		placebo	0,15±0,10	0,17±0,14	CD19+ (x10 ⁹ /L ćelija)	Lafti ® L10	0,18±0,07	0,21±0,17	0,214, 0,116	0,550, 0,028	0,420, 0,051		placebo	0,19±0,04	0,28±0,14	CD11b+ (x10 ⁹ /L ćelija)	Lafti ® L10	3,81±1,52	2,96±1,17	0,764, 0,007	0,230, 0,101	0,140, 0,149		placebo	4,00±1,59	4,52±1,88	CD4+/CD8+	Lafti ® L10	1,30±0,04	1,41±0,07	0,001†, 0,489	0,001†, 0,462	0,020†, 0,350		placebo	1,28±0,05	1,29±0,06								
Granulociti (x10 ⁹ /L ćelija)	Lafti ® L10	4,42±1,04	4,31±1,61	0,420, 0,047	0,226, 0,103	0,352, 0,062																																																																																																											
	placebo	4,37±1,96	4,60±1,91				CD3+CD4+ (x10 ⁹ /L ćelija)	Lafti ® L10	0,82±0,32	0,89±0,26	0,330, 0,073	0,679, 0,014	0,073, 0,227		placebo	0,77±0,12	0,89±0,40	CD3+CD8+ (x10 ⁹ /L ćelija)	Lafti ® L10	0,63±0,34	0,46±0,07	0,711, 0,012	0,100, 0,209	0,296, 0,090		placebo	0,58±0,13	0,70±0,21	CD3-CD56+ (x10 ⁹ /L ćelija)	Lafti ® L10	0,16±0,09	0,12±0,07	0,198, 0,124	0,520, 0,033	0,006*, 0,449		placebo	0,24±0,20	0,13±0,14	CD4+CD45RO+ (x10 ⁹ /L ćelija)	Lafti ® L10	0,43±0,30	0,39±0,27	0,785, 0,006	0,535, 0,030	0,394, 0,056		placebo	0,44±0,09	0,52±0,19	CD8+CD45RO+ (x10 ⁹ /L ćelija)	Lafti ® L10	0,12±0,07	0,13±0,09	0,745, 0,008	0,811, 0,005	0,396, 0,056		placebo	0,15±0,10	0,17±0,14	CD19+ (x10 ⁹ /L ćelija)	Lafti ® L10	0,18±0,07	0,21±0,17	0,214, 0,116	0,550, 0,028	0,420, 0,051		placebo	0,19±0,04	0,28±0,14	CD11b+ (x10 ⁹ /L ćelija)	Lafti ® L10	3,81±1,52	2,96±1,17	0,764, 0,007	0,230, 0,101	0,140, 0,149		placebo	4,00±1,59	4,52±1,88	CD4+/CD8+	Lafti ® L10	1,30±0,04	1,41±0,07	0,001†, 0,489	0,001†, 0,462	0,020†, 0,350		placebo	1,28±0,05	1,29±0,06																			
CD3+CD4+ (x10 ⁹ /L ćelija)	Lafti ® L10	0,82±0,32	0,89±0,26	0,330, 0,073	0,679, 0,014	0,073, 0,227																																																																																																											
	placebo	0,77±0,12	0,89±0,40				CD3+CD8+ (x10 ⁹ /L ćelija)	Lafti ® L10	0,63±0,34	0,46±0,07	0,711, 0,012	0,100, 0,209	0,296, 0,090		placebo	0,58±0,13	0,70±0,21	CD3-CD56+ (x10 ⁹ /L ćelija)	Lafti ® L10	0,16±0,09	0,12±0,07	0,198, 0,124	0,520, 0,033	0,006*, 0,449		placebo	0,24±0,20	0,13±0,14	CD4+CD45RO+ (x10 ⁹ /L ćelija)	Lafti ® L10	0,43±0,30	0,39±0,27	0,785, 0,006	0,535, 0,030	0,394, 0,056		placebo	0,44±0,09	0,52±0,19	CD8+CD45RO+ (x10 ⁹ /L ćelija)	Lafti ® L10	0,12±0,07	0,13±0,09	0,745, 0,008	0,811, 0,005	0,396, 0,056		placebo	0,15±0,10	0,17±0,14	CD19+ (x10 ⁹ /L ćelija)	Lafti ® L10	0,18±0,07	0,21±0,17	0,214, 0,116	0,550, 0,028	0,420, 0,051		placebo	0,19±0,04	0,28±0,14	CD11b+ (x10 ⁹ /L ćelija)	Lafti ® L10	3,81±1,52	2,96±1,17	0,764, 0,007	0,230, 0,101	0,140, 0,149		placebo	4,00±1,59	4,52±1,88	CD4+/CD8+	Lafti ® L10	1,30±0,04	1,41±0,07	0,001†, 0,489	0,001†, 0,462	0,020†, 0,350		placebo	1,28±0,05	1,29±0,06																														
CD3+CD8+ (x10 ⁹ /L ćelija)	Lafti ® L10	0,63±0,34	0,46±0,07	0,711, 0,012	0,100, 0,209	0,296, 0,090																																																																																																											
	placebo	0,58±0,13	0,70±0,21				CD3-CD56+ (x10 ⁹ /L ćelija)	Lafti ® L10	0,16±0,09	0,12±0,07	0,198, 0,124	0,520, 0,033	0,006*, 0,449		placebo	0,24±0,20	0,13±0,14	CD4+CD45RO+ (x10 ⁹ /L ćelija)	Lafti ® L10	0,43±0,30	0,39±0,27	0,785, 0,006	0,535, 0,030	0,394, 0,056		placebo	0,44±0,09	0,52±0,19	CD8+CD45RO+ (x10 ⁹ /L ćelija)	Lafti ® L10	0,12±0,07	0,13±0,09	0,745, 0,008	0,811, 0,005	0,396, 0,056		placebo	0,15±0,10	0,17±0,14	CD19+ (x10 ⁹ /L ćelija)	Lafti ® L10	0,18±0,07	0,21±0,17	0,214, 0,116	0,550, 0,028	0,420, 0,051		placebo	0,19±0,04	0,28±0,14	CD11b+ (x10 ⁹ /L ćelija)	Lafti ® L10	3,81±1,52	2,96±1,17	0,764, 0,007	0,230, 0,101	0,140, 0,149		placebo	4,00±1,59	4,52±1,88	CD4+/CD8+	Lafti ® L10	1,30±0,04	1,41±0,07	0,001†, 0,489	0,001†, 0,462	0,020†, 0,350		placebo	1,28±0,05	1,29±0,06																																									
CD3-CD56+ (x10 ⁹ /L ćelija)	Lafti ® L10	0,16±0,09	0,12±0,07	0,198, 0,124	0,520, 0,033	0,006*, 0,449																																																																																																											
	placebo	0,24±0,20	0,13±0,14				CD4+CD45RO+ (x10 ⁹ /L ćelija)	Lafti ® L10	0,43±0,30	0,39±0,27	0,785, 0,006	0,535, 0,030	0,394, 0,056		placebo	0,44±0,09	0,52±0,19	CD8+CD45RO+ (x10 ⁹ /L ćelija)	Lafti ® L10	0,12±0,07	0,13±0,09	0,745, 0,008	0,811, 0,005	0,396, 0,056		placebo	0,15±0,10	0,17±0,14	CD19+ (x10 ⁹ /L ćelija)	Lafti ® L10	0,18±0,07	0,21±0,17	0,214, 0,116	0,550, 0,028	0,420, 0,051		placebo	0,19±0,04	0,28±0,14	CD11b+ (x10 ⁹ /L ćelija)	Lafti ® L10	3,81±1,52	2,96±1,17	0,764, 0,007	0,230, 0,101	0,140, 0,149		placebo	4,00±1,59	4,52±1,88	CD4+/CD8+	Lafti ® L10	1,30±0,04	1,41±0,07	0,001†, 0,489	0,001†, 0,462	0,020†, 0,350		placebo	1,28±0,05	1,29±0,06																																																				
CD4+CD45RO+ (x10 ⁹ /L ćelija)	Lafti ® L10	0,43±0,30	0,39±0,27	0,785, 0,006	0,535, 0,030	0,394, 0,056																																																																																																											
	placebo	0,44±0,09	0,52±0,19				CD8+CD45RO+ (x10 ⁹ /L ćelija)	Lafti ® L10	0,12±0,07	0,13±0,09	0,745, 0,008	0,811, 0,005	0,396, 0,056		placebo	0,15±0,10	0,17±0,14	CD19+ (x10 ⁹ /L ćelija)	Lafti ® L10	0,18±0,07	0,21±0,17	0,214, 0,116	0,550, 0,028	0,420, 0,051		placebo	0,19±0,04	0,28±0,14	CD11b+ (x10 ⁹ /L ćelija)	Lafti ® L10	3,81±1,52	2,96±1,17	0,764, 0,007	0,230, 0,101	0,140, 0,149		placebo	4,00±1,59	4,52±1,88	CD4+/CD8+	Lafti ® L10	1,30±0,04	1,41±0,07	0,001†, 0,489	0,001†, 0,462	0,020†, 0,350		placebo	1,28±0,05	1,29±0,06																																																															
CD8+CD45RO+ (x10 ⁹ /L ćelija)	Lafti ® L10	0,12±0,07	0,13±0,09	0,745, 0,008	0,811, 0,005	0,396, 0,056																																																																																																											
	placebo	0,15±0,10	0,17±0,14				CD19+ (x10 ⁹ /L ćelija)	Lafti ® L10	0,18±0,07	0,21±0,17	0,214, 0,116	0,550, 0,028	0,420, 0,051		placebo	0,19±0,04	0,28±0,14	CD11b+ (x10 ⁹ /L ćelija)	Lafti ® L10	3,81±1,52	2,96±1,17	0,764, 0,007	0,230, 0,101	0,140, 0,149		placebo	4,00±1,59	4,52±1,88	CD4+/CD8+	Lafti ® L10	1,30±0,04	1,41±0,07	0,001†, 0,489	0,001†, 0,462	0,020†, 0,350		placebo	1,28±0,05	1,29±0,06																																																																										
CD19+ (x10 ⁹ /L ćelija)	Lafti ® L10	0,18±0,07	0,21±0,17	0,214, 0,116	0,550, 0,028	0,420, 0,051																																																																																																											
	placebo	0,19±0,04	0,28±0,14				CD11b+ (x10 ⁹ /L ćelija)	Lafti ® L10	3,81±1,52	2,96±1,17	0,764, 0,007	0,230, 0,101	0,140, 0,149		placebo	4,00±1,59	4,52±1,88	CD4+/CD8+	Lafti ® L10	1,30±0,04	1,41±0,07	0,001†, 0,489	0,001†, 0,462	0,020†, 0,350		placebo	1,28±0,05	1,29±0,06																																																																																					
CD11b+ (x10 ⁹ /L ćelija)	Lafti ® L10	3,81±1,52	2,96±1,17	0,764, 0,007	0,230, 0,101	0,140, 0,149																																																																																																											
	placebo	4,00±1,59	4,52±1,88				CD4+/CD8+	Lafti ® L10	1,30±0,04	1,41±0,07	0,001†, 0,489	0,001†, 0,462	0,020†, 0,350		placebo	1,28±0,05	1,29±0,06																																																																																																
CD4+/CD8+	Lafti ® L10	1,30±0,04	1,41±0,07	0,001†, 0,489	0,001†, 0,462	0,020†, 0,350																																																																																																											
	placebo	1,28±0,05	1,29±0,06																																																																																																														

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost±SD.

* Razlike među grupama: na početku studije (p= 0,041), na kraju studije (p= 0,082).

† Razlika među grupama: na početku studije (p=0,78), na kraju studije (p=0,02). Razlika između vrednosti na početku i kraju studije: probiotik: (p<0,001)

4.4 Uticaj suplementacije sojem *L. helveticus* L10 na parametre oksidativnog statusa, oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite

Kao pregledni parametri oksidativnog statusa određivani su TAS, TOS i PAB. Uočen je značajan efekat vremena za TOS, ali *post hoc* analiza nije otkrila značajne razlike tokom studije ni za jednu od eksperimentalnih grupa. Ipak, u obe grupe ispitanika je došlo značajnog rasta nivoa TAS (značajan efekat vremena: $F(1,30)=61,02$, $p=0,000$, $\eta^2=0,854$).

Kao markeri oksidativnog stresa, praćeni su nivo MDA, kao parameter lipidne peroksidacije i nivo AOPP, kao parameter oksidativnog oštećenja proteina. Nivo MDA je na kraju studije bio značajno smanjen: značajan efekat interakcije $F(1,30)=5,33$, $p=0,033$, $\eta^2=0,145$, *post hoc* analiza je ukazala na značajnu razliku tokom studije u eksperimentalnoj grupi ($p=0,051$). Premda je postojao značajan efekat grupe za nivo AOPP: $F(1,30)=6,41$, $p=0,019$, $\eta^2=0,226$, sa višim vrednostima u probiotskoj grupi na početku studije ($p=0,005$), razlike među grupama nisu nađene na kraju studije.

Kao parametri antioksidativne zaštite određivana je aktivnost PON1 prema paraoksonu i aktivnost ekstracelularne SOD.

Aktivnost PON1 je značajno snižena na kraju studije (efekat vremena: $F(1,30)=69,06$, $p=0,000$, $\eta^2=0,712$) u obe grupe ispitanika, dok je aktivnost SOD smanjena brojčano, ali bez dostizanja statističke značajnosti.

Zanimljiv nalaz ovog dela istraživanja je da su svi parametri oksidativnog stresa bili iznad, a markeri antioksidantne zaštite ispod referentnih vrednosti (Kotur-Stevuljević, 2007). Ovaj rezultat ukazuje na to da FA dovodi do povećanja oksidativnog stresa i ispoljava kumulativne efekte na oksidaciju lipida i proteina, bar u ovoj specifičnoj grupi vrhunskih sportista.

Rezultati su predstavljeni u Tabeli 17.

Tabela 17. Parametri oksidativnog statusa i antioksidativne zaštite na početku i kraju studije u probiotskoj i placebo grupi

		<i>Vreme</i>		ANOVA			
		Pre studije	<i>Nakon studije</i>	Referentne vrednosti	Efekat interakc. (p, η^2)	Efekat vremena (p, η^2)	Efekat tretmana (p, η^2)
MDA ($\mu\text{mol/L}$)	Lafti ® L10	2,6±0,34	2,1± 0,90				
	placebo	2,4±0,62	2,5±0,62	<2,5	0,033 ^a	0,298	0,803
TOS ($\mu\text{mol/L}$)	Lafti ® L10	27±22	19±17				
	placebo	17±15	12±4,5	1,5-13	0,738	0,040 ^b	0,123
TAS ($\mu\text{mol/L}$)	Lafti ® L10	665± 178	800±148				
	placebo	632±156	777±166	900-1400	0,840	0,000 ^c	0,578
AOPP ($\mu\text{mol/L}$)	Lafti ® L10	55±23	39±22				
	placebo	31±11	38±11	18-33	0,471	0,061	0,019 ^d
PON (U/L)	Lafti ® L10	400 (330-804)	331 (177-623)				
	placebo	381 (403-663)	257 (254-414)	200-1080	0,660	0,000 ^e	0,594
SOD (U/L)	Lafti ® L10	46 (41-53)	42 (35-45)				
	placebo	38 (30-50)	36 (33-41)	>100	0,889	0,259	0,350
PAB (U/L)	Lafti ® L10	95(79-127)	98 (63-117)				
	placebo	88 (78-136)	93 (67-109)	0-45	0,785	0,535	0,394

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD ili kao medijana (95% interval pouzdanosti)

a) Razlika između vrednosti na početku i kraju studije: probiotska grupa: p=0,051, placebo grupa: p=0,538; na početku studije: razlika između probiotske i placebo grupe: p=0,055, a na kraju studije: p=0,305

b) Razlika između vrednosti na početku i kraju studije: probiotska grupa: p=0,105, placebo: p=0,186

c) Razlika između vrednosti na početku i kraju studije: probiotska grupa: p=0,007, placebo grupa: p=0,002

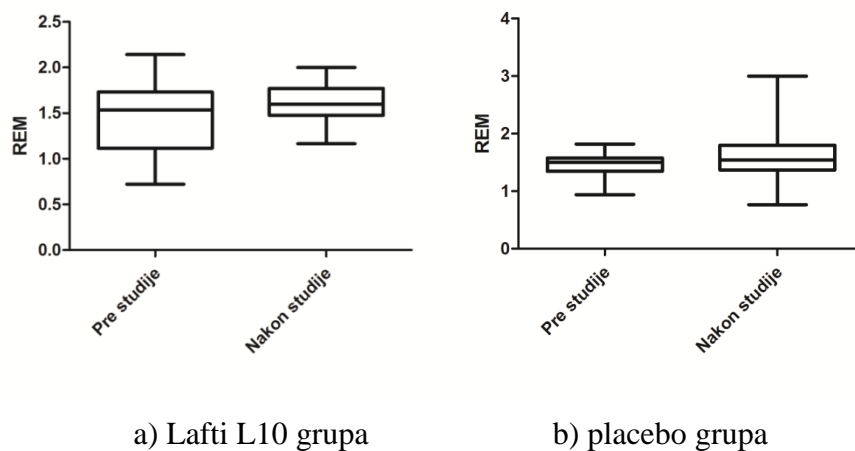
d) Razlika između probiotske i placebo grupe: na početku studije: p=0,005, na kraju studije: p=0,925

e) Razlika između vrednosti na početku i kraju studije: probiotska grupa: p=0,000, placebo: p=0,000

4.4.1 Uticaj suplementacije sojem *L. helveticus* L10 na parametre oksidativnog stresa i statusa u LDL frakciji

Kako bi se procenila dubina oksidativno-stresnog oštećenja, kao i mogućnost sprečavanja tih procesa upotrebom probiotika, izolovane su LDL i HDL lipoproteinske frakcije. LDL frakcija je zatim oksidovana u reakciji sa Cu^{2+} . U izolovanim frakcijama su zatim određeni MDA, TAS i TOS.

Nije uočen efekat vremena, grupe ili interakcije ni za jedan od parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite, kako u oksidovanoj, tako i nativnoj LDL frakciji (Tabela 18). REM, koje predstavljaju odnos dužina traka koje odgovaraju oksidovanoj i neoksidovanoj frakciji istog uzorka, respektivno, su se povećavale posle perioda suplementacije, odnosno upotrebe placeba. Drugim rečima, LDL čestice su postale osetljivije na egzogenu oksidaciju. Međutim, ta razlika nije bila statistički značajna (Slika 23).



Slika 23. Relativne migracione daljine nakon izvođenja elektroforeze u: a) probiotskoj grupi b) placebo grupi

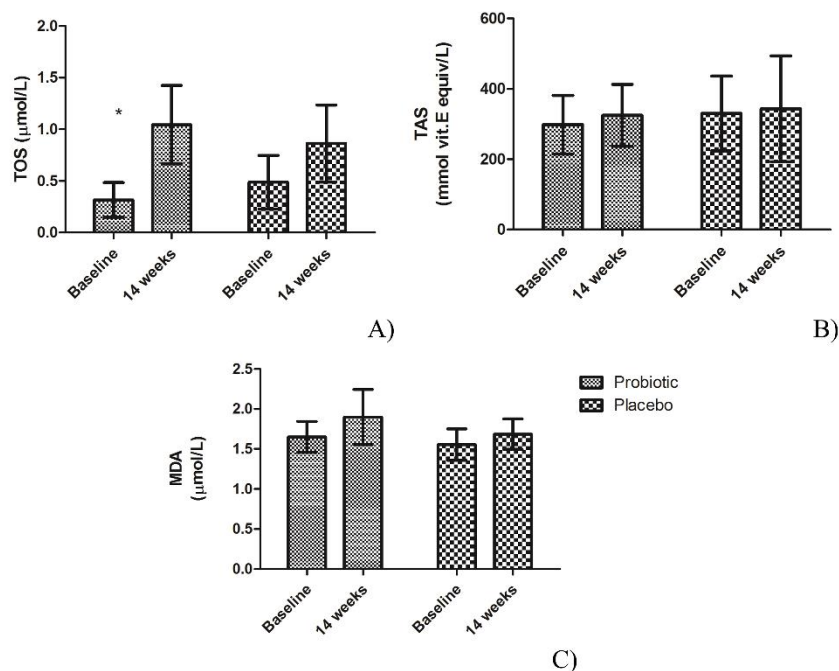
Tabela 18. Parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u oksidovanoj i nativnoj LDL frakciji u probiotskoj i placebo grupi na početku i kraju studije

		<i>Pre studije</i>	<i>Nakon studije</i>	<i>Efekat interakcije (p, η²)</i>	<i>Efekat vremena (p, η²)</i>	<i>Efekat grupe (p, η²)</i>
LDL frakcija						
TOS (μmol/L)	Lafti ® L10	15(14-24)	17(15-20)	0,387, 0,027	0,996, 0,001	0,191, 0,060
	placebo	14(12-21)	17(14-24)			
MDA (μmol/L)	Lafti ® L10	2,15(1,47-2,53)	2,22(1,34-4,40)	0,601, 0,020	0,883, 0,020	0,902, 0,001
	placebo	1,70(0,24-5,36)	1,56(0,98-3,66)			
TAS (μmol/L)	Lafti ® L10	151±26,7	161±2,13	0,919, 0,001	0,084, 0,130	0,830, 0,001
	placebo	152±28,2	163±8,08			
Oxidovana LDL frakcija						
TOS (μmol/L)	Lafti ® L10	245(162-252)	244(198-256)	0,671, 0,008	0,170, 0,080	0,685, 0,008
	placebo	244(240-245)	240(237-246)			
MDA (μmol/L)	Lafti ® L10	3,48(3,41-3,70)	3,48(3,33-3,70)	0,229, 0,054	0,336, 0,046	0,883, 0,003
	placebo	3,51(3,41-3,63)	3,44(3,33-3,63)			
TAS (μmol/L)	Lafti ® L10	1312±55	1329±46	0,684, 0,010	0,234, 0,082	0,157, 0,144
	placebo	1343±62	1351±83			

Rezultati su prikazani kao srednja vrednosti ±SD ili medijana (95% interval pouzdanosti)

4.4.2 Uticaj suplementacije sojem *L. helveticus* L10 na parametre oksidativnog statusa i stresa u HDL frakciji

Nije uočen značaj efekat interakcija ni za jedan od određivanih parametara u HDL frakciji. Uočen je značajni efekat vremena za TOS u HDL frakciji $F(1,30)=7,617$, $p=0,010$, $\eta^2=0,227$. *Post hoc* analiza je pokazala da je značajni porast ovog parametra zabeležen u probiotskoj grupi ($p=0,011$), ali ne i u placebo grupi ($p=0,327$). Međutim, nije uočena promena za MDA ni TAS ni u jednoj od grupa ispitanika (Slika 24).



Slika 24. Parametri oksidativnog statusa i stresa u HDL frakciji u Lafti L10 i placebo grupi na početku i kraju studije: a)TOS b) TAS c) MDA

4.5 Biohemijski parametri i kardiovaskularni rizik

Statistička analiza biohemijskih parametara (lipidni status, glukoza, albumin, bilirubin, mokraćna kiselina) je podrazumevala upotrebu dvofaktorske analize varijanse (ANOVA) sa ponavljanjem, sa *Bonferoni post hoc* testom. Ni za jedan od parametara lipidnog statusa nije zabeležen značajan efekat interakcije (Tabela 19). Svi biohemijski parametri su se našli u raponu referentnih vrednosti.

Tabela 19. Biohemijski parametri u suplementiranoj i placebo grupi na početku i kraju studije

		Vreme		ANOVA			
		Pre studije	Nakon studije	Referentne vrednosti	Efekat interak. (p, η^2)	Efekat vremena (p, η^2)	Efekat grupe (p, η^2)
TC (mmol/L)	Lafti ® L10	4,3±0,60	4,0±0,61	< 5,2	0,172	0,992	0,045 ^a
	placebo	4,6±0,52	4,8±0,62				
HDL-C (mmol/L)	Lafti ® L10	1,2±0,25	1,5±0,33	>1,17	0,263	0,011 ^b	0,711
	placebo	1,2±0,26	1,4±0,34				
LDL-C (mmol/L)	Lafti ® L10	2,8±0,63	2,2±0,57	<3,3	0,262	0,004 ^c	0,168
	placebo	3,0±0,49	2,7±0,85				
TGC (mmol/L)	Lafti ® L10	0,63±0,19	0,92±0,37	<1,7	0,438	0,037 ^d	0,163
	placebo	0,77±0,31	1,4±1,2				
Glukoza (mmol/L)	Lafti ® L10	4,4±0,54	4,4±0,29	3,9–5,5	0,195	0,063	0,632
	placebo	4,3±0,42	4,7±0,68				
Bilirubin (µmol/L)	Lafti ® L10	4,1 (3,5-8,1)	9,0 (5,5-17)	<26	0,927	0,031 ^e	0,749
	placebo	5,4 (3,5-10)	11 (5,9-18)				
Mokraćna kis. (µmol/L)	Lafti ® L10	239±46	235±84	180-420	0,867	0,606	0,818
	placebo	268±66	259±74				
Albumin (g/L)	Lafti ® L10	41±3,01	42±3,05	35-50	0,764	0,230	0,140
	placebo	43±2,84	42±1,49				

Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost ±SD

^a Razlika između vrednosti probiotske i placebo grupe: početak studije: p=0,219, na kraju studije: p=0,024

^b Razlika između vrednosti na početku i kraju studije: probiotska grupa: p=0,008, placebo grupa: p=0,261

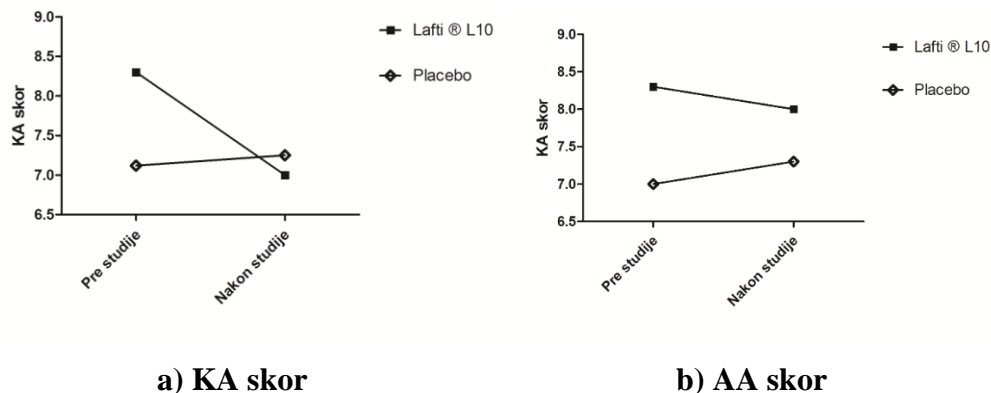
^c Razlika između vrednosti na početku i kraju studije: probiotska grupa: p=0,004, placebo grupa: p=0,159

^d Razlika između vrednosti na početku i kraju studije: probiotska grupa: p=0,283, placebo grupa: p=0,056

^e Razlika između vrednosti na početku i kraju studije: probiotska grupa: p=0,084, placebo grupa: p=0,148

Kardiovaskularni rizik

Tokom studije nije došlo do promene kardiovaskularnog rizika sportista, tj. verovatnoće nastanka aterosklerotskih promena na arterijama ni u jednoj od grupa ispitanika (Slika 25). Ipak, utvrđena je statistički značajna inverzna korelacija između AA skora i nivoa SOD ($r=-0,34$, $p=0,03$).

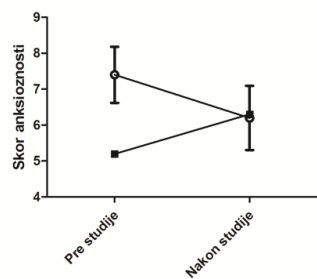


Slika 25. Rizik od postojanja značajnih aterosklerotskih promena na: a) koronarnim arterijama b) abdominalnim arterijama

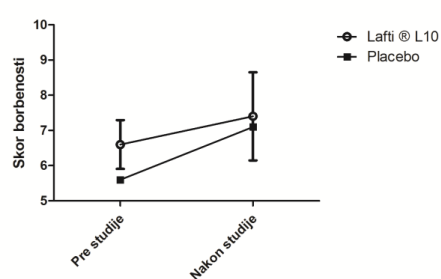
Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD

4.6 Uticaj soja *L. helveticus* L10 na raspoloženje (upitnik o stanju raspoloženja)

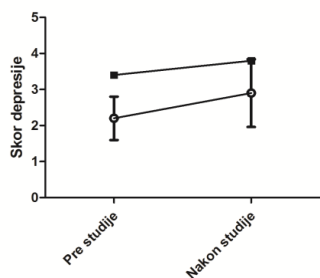
Analizom upitnika o stanju raspoloženja nije utvrđena značajna razlika u rezultatima koji se tiču skorova za stanje anksioznosti, depresije, borbenosti, konfuznosti, zamora, kao i totalnog osećaja uznemirenosti (Slika 26). Ipak, došlo je značajnih promena subjektivnog osećaja snage (efekat interakcije: $F(1,37) = 11.76$, $p=0.009$, $\eta^2 = 0.595$). *Post hoc* test je pokazao značajan porast osećaja snage jedino u suplementiranoj grupi ($p=0,012$), pri čemu značajne razlike među grupama nisu zabeležene kako na početku studije ($p=0,706$), tako ni nakon studije ($p=0,087$).



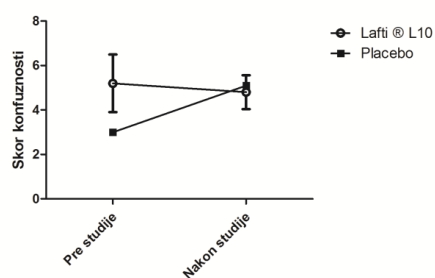
a) anksioznost



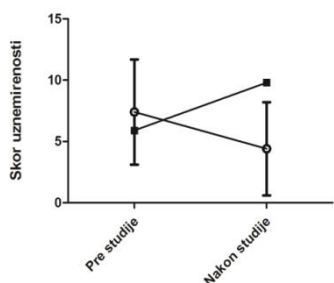
b) borbenost



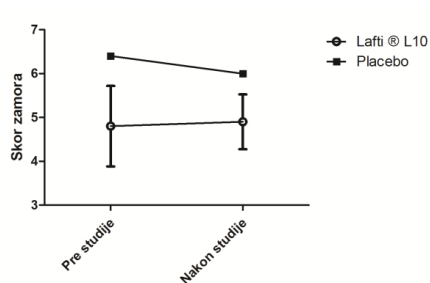
c) depresija



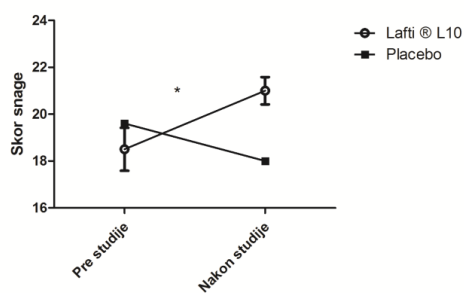
d) konfuznost



e) uznemirenost



f) zamor



f) snaga

Slika 26. Rezultati POMS upitnika pre i nakon studije. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD.

* značajna razlika u odnosu na početak studije

4.7 Uticaj soja *L. helveticus* L10 na sportske performanse

Sportske performanse i uticaj treninga na respiratorne simptome

Suplementacija sojem *L. helveticus* L10 nije uzrokovala promenu sportskih performansi, tj. maksimalnog aerobnog kapaciteta, kao ni ostalih parametara ergospirometrijskog ispitivanja. Rezultati su dati u Tabeli 20 za muškarce, a u Tabeli 21 za devojke. Suplementacija sojem *L. helveticus* L10 nije izazvala značajne promene u nivou maksimalnog aerobnog kapaciteta. Nije zabeležena ni razlika uticaja respiratornih simptoma na trening. Udeo ispitanika koji su prijavili oštećenje treninga usled pojave respiratornih simptoma je bila slična u obe grupe, dok se i ukupan broj dana kada sportsiti nisu trenirali usled bolesti nije razlikovao između tretmana (Tabela 22).

Tabela 20. Rezultati kardiopulmonalnog testiranja kod muškaraca u Lafti L10 i placebo grupi na početku i kraju studije

	<i>Lafti® L10</i>		Placebo	
	Pre studije	Nakon studije	Pre studije	Nakon studije
VO ₂ max	48 ± 1,3	49 ± 7,0	46 ± 6,4	49 ± 5,4
HR max (u/min)	186 ± 7,5	194 ± 6,3	186 ± 4,2	188 ± 4,6
HR oporavak u 1. min (u/min)	160 ± 9,1	161 ± 20,6	166 ± 7,7	168 ± 7,4
HR oporavak u 2. min (u/min)	136 ± 10	127 ± 20,7	140 ± 11	140 ± 15
HR oporavak u 3. min (u/min)	124 ± 10	115 ± 23,0	124 ± 2,6	126 ± 15
maksimalna brzina (km/h)	14 ± 0	13 ± 0,7	14 ± 2,0	13 ± 2,5
respiratorni koeficijent	1,03 ± 0,03	1,1 ± 0,06	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,06
vreme trajanja testa (s)	609 ± 11	585 ± 30	593 ± 68	577 ± 37

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD

Tabela 21. Rezultati kardiopulmonalnog testiranja kod devojaka u Lafti® L10 i placebo grupi na početku i kraju studije

	<i>Lafti® L10</i>		Placebo	
	Pre studije	Nakon studije	Pre studije	Nakon studije
VO ₂ max	57 ± 9,8	57 ± 8,9	65 ± 10	63 ± 6,1
HR max (u/min)	186 ± 7,6	189 ± 9,9	191 ± 7,3	187 ± 14
HR oporavak u 1. min (u/min)	158 ± 11	161 ± 10	157 ± 3,5	160 ± 8,2
HR oporavak u 2. min (u/min)	133 ± 12	133 ± 14	131 ± 13	130 ± 7,1
HR oporavak u 3. min (u/min)	122 ± 12,3	122 ± 11	117 ± 11	116 ± 12
maksimalna brzina (km/h)	18 ± 2,8	18,7 ± 2,4	18,8 ± 1,3	19 ± 2,6
respiratorni koeficijent	1,01 ± 0,04	1,1 ± 0,08	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,04
vreme trajanja testa (s)	658 ± 160	645 ± 142	688 ± 125	663 ± 85

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD.

Tabela 22. Uticaj respiratornih simptoma na treniranje tokom studije

	Lafti L10®	Placebo	p
Uticaj bolesti na treniranje	23±26	29±23	0,57
Ukupan broj dana bez treniranja	2,0±3,1	1.7±2.3	0,48
Proporcija sportista koji su prijavili oštećenost treniranja	40%	42%	0,054

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD

5 Diskusija

Rezultati ove studije ukazali su na to da suplementacija probiotskim sojem *L. helveticus* L10 tokom 14 nedelja zimskog perioda dovodi do smanjenja dužine trajanja i broja simptoma infekcija gornjih respiratornih puteva vrhunskih sportista. Ovi pozitivni klinički ishodi se mogu pripisati imunomodulatornim svojstvima soja *L. helveticus* L10, tj. sposobnosti održanja nivoa mukoznog i humoralnog imuniteta. Ojačanje humoralnog imuniteta je najverovatnije povezano sa povećanjem odnosa CD4+/CD8+ ćelija. Ipak, soj Lafti L10 najverovatnije ne poseduje antioksidativne osobine. Sa druge strane, rezultati studije su ukazali da intenzivna FA dovodi do povećanja oksidativnog stresa i da pokazuje kumulativne efekte na oksidaciju lipida i proteina.

Demografski i antropometrijski podaci na početku studije i opterećenost treniranja tokom studije se nisu razlikovali među ispitanicima grupa, dok je komplijansa bila slična (probiotska vs. placebo grupa, 0,95 vs. 0,94, respektivno). Nije uočena ni razlika u broju korišćenih dodatnih suplemenata ili lekova bez recepta u svrhu olakšanja respiratornih simptoma. Ipak, nedostatak ove studije je relativno mali broj ispitanika, što je možda smanjilo verovatnoću za utvrđivanje statistički značajnih promena određenih parametara koji su praćeni tokom studije. Međutim, cilj ove studije je bio da se prate upravo oni sportisti koji se nalaze pod visokim rizikom od respiratornih infekcija, tj. koji treniraju najmanje 11 h na nedeljnom nivou (Gleeson i sar., 2013). Ispitanici su bili vrhunski sportisti, osvajači medalja na takmičenjima nacionalnog, balkanskog, evropskog i svetskog ranga, koje je, najpre, teško regrutovati u većem broju, a zatim i pratiti na svakodnevnom nivou tokom nekoliko meseci trajanja studije, pogotovo ako se uzmu obzir njihova stalna putovanja van zemlje i konstantan psihološki pritisak.

5.1 Uticaj suplementacije sojem *L. helveticus* L10 na respiratorne infekcije

Retrospektivne i prospektivne longitudinalne studije ukazuju na činjenicu da su respiratorne infekcije u većoj meri prisutne u populaciji sportista koji intenzivno treniraju, pogotovo ukoliko ne postoji adekvatan odmor između uzastopnih sesija FA (Gleeson i sar, 2013; Walsh i sar, 2011). U tom smislu najbitniji rezultat ove studije predstavlja smanjenje dužine trajanja i broja simptoma respiratornih infekcija nakon 14-nedeljne suplementacije probiotskim sojem. Pored toga, iako statistička značajnost nije dostignuta, zabeležen je trend smanjenja ozbiljnosti respiratornih simptoma u probiotskoj grupi. Ovi rezultati su u skladu sa sličnim studijama izvedenim u populaciji ragbista (Haywood i sar., 2013) i maratonaca (Cox i sar.,

2010). Međutim, slični rezultati su zabeleženi i u ostalim imunološki osetljivim populacijama, kao što su starije osobe (Guillemard i sar., 2010), deca (Kloster i sar, 2008; Leyer i sar, 2009; Hojsak i sar, 2010; Kumpu i sar.2012;), ali i u opštoj populaciji (de Vrese i sar, 2005; Niborski i sar, 2008).

Sa druge strane, udeo sportista koji su prijavili respiratornu infekciju bio je u obe grupe ispitanika vrlo slična. Međutim, ovi rezultati nisu u saglasnosti sa aktuelnom *Cochrane* meta-analizom, čiji je zaključak da suplementacija probiotskim mikroorganizmima smanjuje učestalost akutnih respiratornih infekcija u odnosu na placebo (Hao i sar, 2015). Ovo može predstavljati poseban značaj za sportsku populaciju, posebno ako se uzme u obzir da se infekcije javljaju u pripremnom periodu i tokom takmičenja, što posledično dovodi do lošijih sportskih performansi i slabijih postignuća (Gleeson i sar., 2011; West i sar., 2013; Haywood i sar., 2013). Druge studije, pored prevencije respiratornih infekcija, ukazuju i na redukciju pojave GIT infekcija (Kekkonen i sar, 2007; Haywood i sar., 2013). Međutim, broj zabeleženih GIT infekcija tokom ove studije je bio isuviše nizak za detaljniju statističku analizu i donošenje odgovarajućih zaključaka.

Neusaglašenost u rezultatima sprovedene studije i *Cohrane* meta analize u pogledu prevencije respiratornih infekcija probioticima može se objasniti na više načina. Pre svega, imunološki, ali i generalno svi fiziološki efekti probiotika su striktno vezani za specifičnost soja, kao i primenjene suplementirane doze. Stoga je moguće da je upotrebljena doza soja u studiji bila dovoljna za skraćanje dužine trajanja respiratornih infekcija, ali ne i za njihovo sprečavanje. Tome u prilog ide i činjenica da je dnevna doza od $3,2 \times 10^{10}$ CFU tokom 6 nedelja suplementacije indukovala ushodnu regulaciju nekoliko gena povezanih sa delovanjem IFN- γ , proinflamatornog citokina, čiji se deficit povezuje sa povećanom incidencom respiratornih infekcija (Clancy i sar, 2006; van Baarlen, 2011). Dalje, uključenjem relativno malog broja ispitanika u studiju (n=39) je smanjena mogućnost uočavanja statistički značajnih razlika između grupa. Ovo se ogleda u činjenici da je zabeležen trend ka smanjenju ozbiljnosti respiratornih simptoma u probiotskoj grupi (p=0,078). Stoga, naredna istraživanja koja će se baviti ovom tematikom treba da uključe veći broj ispitanika. Sem toga, studija je započeta relativno kasno, sredinom januara. Ako se uzme u obzir da je potrebno 10-14 dana za kolonizaciju GIT-a probioticima, moguće je da je propušten jedan period sezone respiratornih infekcija. Konačno,

sportisti nisu bili u obavezi da ne koriste ostale suplemente i/ili lekove bez recepta u svrhu olakšanja respiratornih simptoma.

Na osnovu izloženih rezultata, zaključuje se da soj *L. helveticus* može da obezbedi izvesne pozitivne efekte u pogledu trajanja respiratornih infekcija, ali ne i da ih spreči, što može biti od pomoći sportistima pre i tokom takmičenja.

5.2 Uticaj suplementacije sojem *L. helveticus* L10 na odabrane parametre mukoznog, humoralnog i celularnog imuniteta

5.2.1 Uticaj soja *L. helveticus* na mukozni imunitet

Rezultati studije su pokazali da je u probiotskoj grupi održan nivo sIgA antitela, dok su u placebo grupi statistički značajno smanjene njihove koncentracije. Ovo potvrđuje da intenzivna FA tokom dužeg perioda ima kumulativni supresivni efekat na mukozni imunitet, što se može prevenirati probiotskom suplementacijom. U datom kontekstu se navedeni rezultati mogu povezati sa skraćanjem trajanja respiratornih infekcija u probiotskoj grupi, što je od posebnog značaja u periodu sportskih takmičenja.

Iako se tokom poslednjih 30 godina vodi diskusija oko kliničkog značaja kratkotrajnih i dugoročnih promena imunskih parametara tokom intenzivne FA, jedino činioci mukoznog imuniteta pokazuju konzistentnu vezu sa rizikom od respiratornih infekcija u sportskoj populaciji (Walsh i sar, 2011). Umerena i intenzivna FA pokazuju različito dejstvo na nivo sIgA antitela u mukoznim površinama. Dok kratkotrajni periodi umerene FA uzrokuju umereno povećanje nivoa sIgA antitela (Walsh i sar, 2011), intenzivno treniranje uzokuje suprotne efekte. Naime, kod sportista sa vrlo visokim intenzitetom treniranja tokom dugog vremenskog perioda uočen je niži nivo i brzina sekrecije sIgA antitela (Walsh i sar, 2011). Značaj sIgA antitela u prevenciji respiratornih infekcija ogleda se u sposobnosti sprečavanja adhezije patogena za mukoznu površinu i njihov dalji prodor u ekstraintestinalna sterilna tkiva, zatim neutralizaciji virusa u epitelnim ćelijama tokom procesa transcitoze i izlučivanju lokalno formiranih imunskih kompleksa na luminalnu površinu (Lamm, 1998).

Intenzivna FA dovodi ne samo do smanjenja apsolutne koncentracije i brzine sekrecije sIgA antitela, već i do redukcije salivarnog protoka. Intenzitet, dužina trajanja i učestalost

treniranja određuju stepen ovih promena (Tiollier E, 2005). Naime, najveće smanjenje salivarnog protoka zabeleženo je nakon supramaksimalnog treninga (Mackinnon i Ginn, 1993), što se objašnjava povećanjem simpatičke aktivnosti koja uzrokuje vazokonstrikciju krvnih sudova pljuvačnih žlezda i ograničava dostupnost vode za proizvodnju salive (Chicharro i sar, 1998). Promena salivarnog protoka i brzine sekrecije sIgA u ovoj studiji nije uočena, verovatno usled velike interindividualne varijabilnosti.

Određene dijetarne intervencije mogu da smanje negativni uticaj intenzivne FA na mukozni imunitet; pozitivni efekti su nađeni nakon suplementacije kvercetinom (Nieman i sar, 2007), ekstraktom alge *Chlorella vulgaris* (Otsuki T, 2011), kolostrumom (Jones i sar, 2014), kofeinom (Bishop i sar, 2006), kao i astaksantinom (Baralić, 2012). Međutim, probiotici takođe poseduju sposobnost održanja mukoznog imuniteta mehanizmima koji još uvek nisu dovoljni izučeni (Tiollier i sar, 2007; Gleeson i sar, 2011). Naime, smatra se da probiotici indukuju porast IgA+ B ćelija T-zavisnim i T-nezavisnim mehanizmima u GIT mukozni, ali i u udaljenim mukoznim tkivima, npr. bronhijalnim ili pljuvačnim žlezdama, nakon migracije u sistemsku cirkulaciju (Gaeldano i sar, 2007, De Moreno de LeBlanc i sar, 2008). Plazma ćelije u pljuvačnoj žlezdi proizvode IgA antitela, koja se izlučuju u salivarni kanal kao sIgA, zatim vezuju za pIgR receptore na mukoznim epitelnim ćelijama, nakon čega se transportuju na luminalnu stranu (Tomasi, 1985). Sa druge strane, neke studije nisu ukazale na uticaj probiotika na mukozni imunitet, što se može i očekivati, s obzirom na usku povezanost između imunomodulatornih efekata i specifičnosti primenjenog soja i doze (Clancy i sar, 2006; Cox i sar, 2010, Gleeson i sar, 2012).

Smanjenje sIgA antitela je zabeleženo kod maratonaca (Nieman, 2002), kajakaša (Mackinnon i sar, 1993), plivača (Gleeson i sar, 1999), kao i nakon „Wingate testa“ (Fahlman i sar, 2001). Smatra se da se nivo sIgA antitela vraća na nivo pre treninga u toku 24 h, međutim, sniženi nivo može ostati i tokom dužeg perioda, ukoliko nakon treninga ekstremnog intenziteta ne postoji odgovarajući odmor (Walsh i sar, 2011).

Rezultati ovog istraživanja ukazuju da suplementacija sojem *L. helveticus* L10 dovodi do održanja mukoznog imuniteta, što je od posebnog značaja za sportiste tokom priprema i takmičenja u borbi protiv respiratornih infekcija. Ipak, neophodne su detaljnije analize kako bi se utvrdio mehanizam delovanja ovog probiotskog soja na mukozni imunitet.

5.2.2 Uticaj soja *L. helveticus* na humoralni imunitet

IgM antitela predstavljaju 10% ukupnih antitela i primarno su locirana intravaskularno; njihova uloga se prvenstveno ogleda u aktivaciji klasičnog puta komplementa (Nieman i Nehlsen-Cannarella, 1991; Abbas i Lichtman, 2006). Ipak, IgG su najbrojnija antitela u serumu i čine oko 75% ukupnih imunoglobulina; postoje 4 izotipa (IgG1-IgG4) koji se razlikuju po strukturi teških lanaca. Iako koncentracija ukupnih IgG antitela varira između individua, proporcija subklasa se održava u relativno uskom opsegu: IgG1, 60-65%; IgG2, 20-25%; IgG3, 5-10%; IgG4, 3-6% (French i Harrison, 1984). IgA antitelo predstavlja oko 15% ukupnih humanih serumskih imunoglobulina (0,8 – 3,0 g/L) i javlja se u 2 izoforme: IgA1 i IgA2 (Nieman i Nehlsen-Cannarella, 1991). Otpornost organizma na ponovnu infekciju generalno se pripisuje održanju odgovarajućeg nivoa antigen-specifičnih imunoglobulina, pre svega IgG i IgA (Welliver i Ogra, 1988), stoga je i jedan od ciljeva ove studije bio da se ispita sposobnost soja Lafti da indukuje, ili ojača humoralni imunski odgovor.

Publikovani su različiti i vrlo često oprečni rezultati o uticaju FA na nivo IgG, IgM i IgA antitela, u zavisnosti od vremena određivanja koncentracije (odmah nakon FA ili u odmoru), dužine (akutne ili hronične) i intenziteta FA, kao i specifičnosti (fizički aktivne ili neaktivne) populacije. Generalno se smatra da u stanju mirovanja nakon akutne umerene FA (5 sesija nedeljno od po 45 min) i kod atletičara koji prelaze manje od 40 km nema promena nivoa imunoglobulina (Nieman i Nehlsen-Cannarella, 1991). Međutim, neke studije su uočile povećanje IgM antitela (Eberhardt i sar, 1971; Nieman i Nehlsen-Cannarella, 1991). Umerena FA tokom 15 nedelja pak, dovodi do povećanja nivoa sva 3 antitela, što je dovedeno u vezu sa beleženjem manjeg broja respiratornih simptoma (Nehlsen-Cannarella i sar, 1991). Ipak, ukoliko se radi o intenzivnoj FA i o maratoncima koji dnevno prelaze preko 40 km, onda se govori o depresiji sekrecije antitela, koja može trajati i do 2 dana (Israel i sar, 1982). Ipak, najverovatnije ovom prilikom zapravo dolazi do mobilizacije antitela iz cirkulacije u tkiva. Naime, poznato je da intenzivna produžena FA dovodi do oštećenja mišića i destrukcije važnih biomolekula u organizmu, što indukuje akutnu proteinsku fazu, koja je slična septičnoj ili aseptičnoj inflamatornoj reakciji (Shek i Shepard, 1998). Tom prilikom odvija se i regrutacija imunokompetentnih ćelija i antitela iz cirkulacije, koje pomažu makrofagama u uklanjanju i reparaciji oštećenih tkiva.

Iako su biološki uzorci sportista sakupljeni u fazi odmora, dakle 12-20 h nakon poslednje sesije FA, uočili smo povećanje nivoa IgM antitela u obe grupe ispitanika. Predloženi su različiti mehanizmi za objašnjenje indukcije povećanja IgM antitela u cirkulaciji. Mehanizmi uključuju nespecifičnu simpatonergičku stimulaciju imunskog sistema, kao i mogućnost stimulacije antigenima različitih patogena, čije su količine tokom FA u organizmu mnogo veće, usled povećane ventilacije i narušavanja mukoznog imuniteta (Nieman i Nehlsen-Cannarella, 1991).

U ovoj studiji nije uočena značajna promena u nivou ukupnih IgG antitela ni u probiotskoj, niti u placebo grupi. Slični rezultati su dobijeni i u studiji autora Gleeson i sar, 2011. Smatra se da je koncentracija IgG antitela najniža 1,5 h nakon završetka treninga, da bi se vratila na bazalni nivo nakon 21 h od treninga. Ipak, postoje studije koje su uočile povećanje IgG antitela nakon probiotske suplementacije (Kim i sar, 2006; Alberda i sar, 2007).

Istovremeno sa održanjem nivoa salivarnog IgA antitela, uočen je i trend očuvanja nivoa sistemskog IgA antitela. Međutim, s obzirom na to da su procesi sekrecije salivarnog i sistemskog IgA antitela regulisani na različite načine i da se odigravaju u različitim delovima imunskog sistema, ne može se sa sigurnošću govoriti o povezanosti ovih rezultata. Naime, pretpostavlja se da se procesi kojima probiotici deluju na mukozni i humoralni imunitet odvijaju drugačijim mehanizmima. U humanoj populaciji postoje dve klase IgA antitela, i to IgA1, koji je većinom lociran u serumu i IgA2, koji dominira u mukoznim tkivima (Monteiro RC, Van De Winkel, 2003). Serumska IgA antitela produkuju B ćelije u koštanoj srži i perifernim limfnim organima (Kutteh i sar, 1982; Crago i sar, 1984), dok sIgA sekretuju B1 peritonealne ćelije i delimično B2 ćelije iz mukoznih limfoidnih tkiva (Macpherson i sar, 2000). Povećanje serumskog nivoa IgA antitela je zabeleženo u populaciji kritičnih bolesnika (Alberda i sar, 2007) i kod kritično bolesne novorođenčadi, što je bilo povezano sa znatno smanjenom stopom nozokomijalne pneumonije (Wang i sar, 2014).

Suplementacija sojem *L. helveticus* L10 najverovatnije dovodi do indukcije specifičnog humoralnog imuniteta. Naime, u probiotskoj grupi je došlo do održanja nivoa serumskog IgA antitela dva soja LAB. Održanje specifičnog IgG antitela protiv *E. faecalis* u probiotskoj grupi dalje ukazuje na sposobnost soja Lafti da indukuje specifični humoralni odgovor. Međutim, nivo specifičnih IgG antitela protiv ostalih ispitivanih urogenitalnih bakterija i LAB je ostao nepromenjen. Inače, IgG antitela su najspecifičnija antitela, koja obezbeđuju imunsku memoriju, učestvuju u neutralizaciji mikroorganizama i toksina, kao i opsonizaciji antigena za fagocitozu

(Abbas i Lichtman, 2006). Takođe, IgG antitela su najbrojnija antitela u respiratornom i alveolarnom prostoru, gde se lociraju nakon difuzije iz sistemske cirkulacije (Reynolds, 1988). Stoga apsolutni ili funkcionalni deficit ovih antitela u respiratornom traktu dovodi do rekurentnih ili hroničnih infekcija. Buduća istraživanja treba da ispitaju specifični humoralni odgovor na veći broj izazivača respiratornih infekcija, u cilju obezbeđivanja kvalitetnih dokaza o efikasnosti soja *L. helveticus* L10 u skraćenu respiratornih infekcija.

Pored velike interindividualne genetičke varijabilnosti ispitanika, postoje i razlike u njihovom kontaktu sa različitim antigenima, što konačno oblikuje profil antitela individualca. Zanimljiv je rezultat smanjenja serumskih specifičnih IgA antitela protiv *L. rhamnosus* LA68 i *L. rhamnosus* LB64 u kontrolnoj grupi, dok je nivo salivarnih IgA antitela prema testiranim bakterijama mlečne kiseline ostao nepromenjen. Pored toga, nije došlo do promene salivarnih i serumskih IgA antitela ni prema jednoj LAB u probiotskoj grupi. Ako se uzme u obzir da sportisti nisu unosili fermentisane proizvode tokom studije, pad specifičnih anti-LAB IgA antitela u placebo grupi se može objasniti izvesnim stepenom unakrsne reaktivnosti između određenih sojeva LAB. Stoga, ovi nalazi ukazuju na održanje nivoa IgA antitela protiv LAB u serumu; ovaj efekat je relativno specifičan, s obzirom na to da je smanjenje u nivou antitela uočen prema određenim sojevima. Konačno, može se zaključiti da je nivo specifičnih salivarnih IgA antitela slab indikator odgovora specifičnog IgA antitela. Do sličnog zaključka se došlo i u drugim studijama (Forrest, 1992; Paineau i sar, 2008).

Slični rezultati o sposobnosti probiotskih sojeva da indukuju specifičan humoralni imunitet su uočeni protiv: rotavirusa (Isolauri et al., 1995), polio virusa (de Vrese et al., 2005), *Haemophilus influenzae* (Kukkonen et al., 2006), *Vibrio cholerae* (Paineau, 2008), enterotoksične *Escherichia coli* (Fang et al, 2000; Ouwehand et al, 2014). Međutim, ne može se povući direktno poređenje našeg sa ovim rezultatima, s obzirom na to da su navedene studije pratile imunski odgovor nakon oralne vakcinacije. Ipak, postoje i studije koje su sličnog dizajna, a takođe su ukazale na indukciju specifičnog humoralnog odgovora. U populaciji male dece nakon suplementacije sojem LGG uočeno je smanjenje ozbiljnosti i dužine epizoda dijareje, što je bilo praćeno povišenjem nivoa IgG+, IgM+ i IgA+ ćelija tokom faze dijareja, kao i serumskih specifičnih antitela protiv rotavirusa tokom perioda oporavka (Kaila et al., 1992, Majamaa et al, 1995). U skorašnjoj studiji (Sindhu et al, 2014) suplementacija istim sojem u

velikoj ispitivanoj dečjoj populaciji bila je povezana sa redukcijom intestinalne permeabilnosti i povećanjem specifičnih IgA i IgG protiv rotavirusa.

Za razliku od indukcije specifičnih IgA i IgG antitela, nije uočena promena IgM ni prema jednoj vrsti od ispitivanih bakterija. Ovi rezultati su očekivani, s obzirom na to da se IgM antitelo prvo sekretuje u imunskom odgovoru i da pokazuje najveći stepen unakrsne reaktivnosti protiv antigena.

Na osnovu iznetih rezultata, zaključuje se da suplementacija sojem *L. helveticus* L10 dovodi do indukcije specifičnog humoralnog imunskog odgovora. Buduća istraživanja treba da se fokusiraju na specifični humoralni odgovor imuniteta na veći broj izazivača respiratornih infekcija, kako bi se detaljnije objasnili mehanizmi kojim soj Lafti doprinosi skraćanju respiratornih infekcija tokom zimskog perioda.

5.2.3 Uticaj soja *L. helveticus* na celularni imunitet

Skraćenje dužine respiratornih infekcija u probiotskoj grupi je najverovatnije posledica sposobnosti soja *L. helveticus* L10 da modulira imunski odgovor. Prethodno izvedene animalne studije su ukazale na nepatogenu i imunomodulatornu prirodu soja *Lactobacillus helveticus* Lafti® L10 (Paturi i sar, 2007, Paturi i sar, 2008), što je i potvrđeno u humanim kliničkim ispitivanjima (Clancy i sar, 2006; van Baarlen i sar, 2011). Naime, suplementacija navedenim sojem tokom 4 nedelje, u dnevnoj dozi od 2×10^{10} CFU povećala je antigenom stimulisanu produkciju IFN- γ . Zatim, suplementacija sojem Lafti tokom 6 nedelja dovela je do ushodne regulacije nekoliko gena povezanih sa delovanjem IFN- γ (van Baarlen i sar, 2011). Međutim, naši rezultati nisu omogućili dalje dokaze sposobnosti soja Lafti da indukuje Th1 odgovor. Naime, uočeno je značajno povećanje nivoa IFN- γ u obe grupe, ali ne i razlika među njima, kako na početku, tako ni nakon završetka suplementacije. Postoji nekoliko mogućih objašnjenja za neusaglašenost u rezultatima. Najpre, ne postoji direktna metodološka analogija sa navedenim studijama, s obzirom na nedostatak placebo grupe u njihovom dizajnu. Studija van Baarlen i sar, 2011 se bavila uticajem soja Lafti na ekspresiju gena povezanih sa imunitetom i uključila je mali broj dobrovoljaca koji nisu bili sportisti. Sa druge strane, populacija studije (Clancy i sar, 2006) jeste bila fizička aktivna, ali je uključila dve grupe sportista: jednu su činili ispitanici koji su patili od rekurentnih respiratornih infekcija, dok su drugu činili sportisti bez navedenih

problema. Obe grupe su primale probiotske kapsule, dok je indukcija IFN- γ uočena jedino u prvoj grupi. Iako je ova studija postavila hipotezu o oštećenosti odgovora IFN- γ usled intenzivne FA za mogući uzrok povišene incidence respiratornih infekcija kod sportista, novija ispitivanja su dala oprečne rezultate: više koncentracije ovog citokina su nađene kod individualaca sa rekurentnim respiratornim infekcijama (Gleeson i Bishop 2013; Gleeson et al, 2013). Stoga, buduća istraživanja treba da detaljnije utvrde uzročno-posledičnu veze FA i sekrecije IFN- γ . Takođe, dodatna razlika u odnosu na rezultate prethodno navedene studije u kojoj je nivo IL-4 u obe grupe ostao nepromenjen tokom studije, je da u našem istraživanju nije detektovan ovaj interleukin ni u jednoj od mernih tačaka, što se može pripisati niskoj osetljivosti korišćenog ELISA kita.

Značajan imunološki medijator u etiopatologiji respiratornih infekcija u sportskoj populaciji je IL-10, čiji su najverovatnije primarni izvor Treg ćelije (Gleeson i Bishop, 2013). Ovaj interleukin inhibira Th1 odgovor, kroz supresiju sekrecije IFN- γ i IL-12 (Maynard i Weaver, 2008). Primećeno je da nivo sekrecije IL-10 nakon stimulacije multivalentnom vakcinom značajno korelira sa brojem respiratornih simptoma i njihovom dužinom trajanja (Gleeson i sar., 2012, Gleeson i sar., 2013). Takođe, više koncentracije su nađene kod sportista sa višim intenzitetom treniranja (Gleeson i sar., 2013). U skladu sa datim nalazima i s obzirom na to da je tokom studije sportska sezona napredovala i blago rastao intenzitet treniranja ispitanika, očekivano bi bilo da nivo IL-10 raste. Međutim, promene u nivou IL-10 nakon antigenske stimulacije nisu bile značajne ni u jednoj grupi ispitanika.

Sem toga, IL-10 smanjuje ekspresiju MHC molekula klase II na APC, oštećujući na taj način diferencijaciju i proliferaciju CD4⁺ ćelija (De Smedt i sar., 1997; Gleeson i Bishop, 2013). Ovo uzrokuje smanjenje odnosa CD4⁺/CD8⁺ (*T helper/T suppressor*). Naime, odnos CD4⁺/CD8⁺ je parametar koji je osetljiv na visoki intenzitet FA i dovodi se u vezu sa akutnim virusnim infekcijama (Chakravarti, 1995). Takođe se smatra da CD4⁺/CD8⁺ > 1,5 može biti od značaja za citokinsku aktivaciju NK i T ćelija i proliferaciju i sazrevanje B ćelija (Shepard, 2000). U probiotskoj grupi je uočen porast odnosa CD4⁺/CD8⁺, a u skladu sa tim i održanje nivoa ukupnih i specifičnih anti-LAB IgA i anti-*E. faecalis* IgG antitela. Pretpostavljamo da su ovi nalazi povezani, jer produkcija antitela zavisi od odnosa CD4⁺ i CD8⁺ populacija. Naime, CD4⁺ Th pomažu B ćelijama u sazrevanju u plazma ćelije koje sekretuju antitela, dok CD8⁺ ćelije blokiraju ovaj proces (Crary i sar. 1983). Stoga, značajno povećanje ovog parametra u

probiotskoj grupi verovatno doprinosi skraćenju dužine respiratornih infekcija, indukujući brže sazrevanje B ćelija i sekreciju antitela. Slični rezultati su uočeni i kod zdravih kod novorođenčadi (Zhang i sar, 2008) nakon suplementacije sojem *L. casei*. Zanimljivi su i rezultati studije izvedene u populaciji kritičnih bolesnika na režimu antibiotske terapije i enteralne ishrane u čiji je sastav uključen jedan soj iz roda *Bifidobacterium*. Došlo je do porasta odnosa CD4+/CD8+, što je bilo praćeno smanjenjem abdominalnog bola i GIT nelagodnosti (Shao i Xu, 2013). Ovakvi efekti nisu uočeni u grupi koja je bila na standardnoj enteralnoj ishrani.

Uočeno je povećanje koncentracije TGF- β 1 u serumu u obe grupe, pri čemu je u placebo grupi porast bio blizu dostizanja statističke značajnosti ($p=0,06$). Blago povećanje nivoa TGF- β 1 je zabeleženo nakon akutne FA, što je najverovatnije posledica oštećenja mišića ili tetiva (Heinemeier i sar, 2003). Porast koncentracije TGF- β 1 traje oko 30 minuta, kada se vrednosti vraćaju na nivo pre FA (Gavin i sar, 2000; Czarkowska-Paczek i sar, 2006; Abbasi i sar, 2013). Ipak, pokazani su kontradiktorni rezultati kada je u pitanju uticaj treniranja tokom dužeg vremenskog perioda na nivo TGF- β 1 (Heinemeier i sar, 2003; Sashihara, i sar, 2013). TGF- β 1 je plejotropni citokin, koji ispoljava veliki broj efekata, uglavnom povezanih sa anti-inflamatornim delovanjem (Kajer i sar, 1996). TGF- β 1 može da inhibira proliferaciju NK ćelija, produkciju IFN- γ produkciju iz NK ćelija, kao i sekreciju IL-12 (Bellone i sar, 1995). Sa druge strane, ovaj citokin takođe ispoljava i pro-inflamatorna dejstva: poseduje esencijalnu ulogu u sekreciji sIgA antitela u mukoznim membranama, deluje kao hemotaksični faktor za granulocite, a sem toga, pojačava njihovu fagocitnu i baktericidnu funkciju (Abbasi i sar, 2013). Pored toga, TGF- β 1 se smatra uzročnikom osećaja zamora, usled inhibicije sinteze glutaminske kiseline u mozgu (Chao i sar. 1992; Pararca, 2001). Ipak, u ovoj studiji nije uočeno povećanje osećaja zamora ni u jednoj grupi, što je u skladu sa nepromenjenom koncentracijom TGF- β 1. Suprotno tome, suplementacija sojem *L. gasseri* u grupi sportista rekreativaca dovela je do smanjenja osećaja zamora i istovremenog smanjenja nivoa TGF- β 1 u serumu (Sashihara, i sar, 2013).

Udeo limfocitnih i leukocitnih populacija ostao je neizmenjen tokom studije u obe grupe ispitanika. Ovakvi rezultati su se donekle mogli očekivati, jer se generalno smatra da se koncentracije imunskih ćelija u krvi retko menjaju po uključenju dijetarnih intervencija, jer predstavljaju bazalne imunološke markere (Albers i sar, 2005). Primećen je efekat grupe za CD3-CD56+ limfocite, što je posledica višeg nivoa ovih ćelija u placebo grupi na početku

studije. Ipak, uočene su velike interindividualne varijacije ispitanika u pogledu udela limfocitnih i leukocitnih populacija.

Sa druge strane, literaturni podaci ukazuju na promenu udela limfocitnih populacija u humanoj populaciji nakon probiotske suplementacije. Tako je suplementacija sojem *L. plantarum* uzrokovala porast Treg, citotoksičnih CD8+CD25+ i CD56+CD16+ ćelija u populaciji starijih osoba (Mane i sar, 2011). Zatim, porast udela NK ćelija je uočen i nakon konzumacije soja *Bacillus polyfermenticus* kod mlađih osoba starosti 20-35 godina (Kim i sar, 2006). Indukcija populacije FoxP3+Treg ćelija nakon 8-nedeljne suplementacije sojem *B. lactis* je zabeležena u studiji autora Konieczna i sar, 2011. Rast CD4+ populacije je uočen i kod zdravih dobrovoljaca nakon suplementacije *L. casei* (Plaza-Diaz i sar, 2013), dok je uvećanje broja CD4+, CD8+ i NK ćelija uočeno u populaciji kritičnih bolesnika na režimu antibiotske terapije, nakon uvođenja enteralne ishrane u čiji su sastav bio uključen probiotik (Shao i Xu, 2013).

MTT test meri metaboličku aktivnost/vijabilnost ćelija nakon antigenske stimulacije i koristi se za procenu funkcionalnog kapaciteta imunskog sistema. Zapravo, ovaj test ukazuje na sposobnost proliferacije limfocita. Akutna intenzivna FA može da ošteti sposobnost proliferacije limfocita nakon antigenske ili mitogenske stimulacije. Pokazano je da intenzivno treniranje ne utiče, ili čak povećava sposobnost proliferacije limfocita nakon stimulacije LPS-om, specifičnog antigena za stimulaciju B ćelija (Field i sar, 1991), dok su suprotni nalazi zabeleženi nakon stimulacije sa ConA, specifičnog mitogena za stimulaciju T ćelija (Fry i sar, 1992). Određeni autori ove nalaze objašnjavaju povećanom produkcijom slobodnih radikala i oksidativnim oštećenjem ćelija, što vodi ka njihovoj apoptozi (Mooren i sar, 2002). Ipak, još uvek nije sasvim razjašnjeno da li je sniženje nivoa cirkulišućih limfocita uzrokovano apoptozom ili njihovom redistribucijom u druge delove imunskog sistema (Steensberg i sar, 2001). Ipak, ni kod jedne grupe ispitanika nije došlo do promene metaboličke aktivnosti/vijabilnosti ćelija nakon stimulacije sa LPS i ConA. Ovakvi rezultati su u saglasnosti sa nalazima nepromenjenih nivoa markera oksidativnog stresa. Sa druge strane, pokazano je da stepen oštećenja proliferacije limfocita zavisi i od nivoa utreniranosti. Tako je 3 sata nakon sesije intenzivne FA kod sedentarnih ispitanika došlo do smanjenja sposobnosti proliferacije limfocita, a kod utreniranih sportista nije uočen taj efekat (Potteiger i sar, 2001). S obzirom da su ispitanici ove studije vrhunski sportisti, naši rezultati su u skladu sa ovi nalazima.

Rezultati određenih animalnih *in vivo* i *in vitro* studija sa humanim ćelijskim linijama su pokazali da probiotskih sojevi imaju sposobnost da povećaju metaboličku aktivnost/vijabilnost ćelija nakon antigenske stimulacije. Tako, nakon inkubacije izolovanih splenocita miša sa sojevima *L. fermentum* i *L. plantarum*, došlo je do povećanja proliferacije limfocita (Lee i sar, 2011). Stimulisani splenociti miševa koji su konzumirali soj *L. rhamnosus* LA68 su pokazali veći indeks proliferacije nakon stimulacije LPS-om (Ivanovic i sar, 2015). Ipak, ovi efekti, kao i ostala imunomodulatorna dejstva probiotika, usko su povezani sa specifičnošću soja.

Na osnovu iznetih rezultata, čini se da soj *L. helveticus* L10 ne poseduje značajnu sposobnost da modifikuje Th1 odgovor. Suplementacija sojem Lafti najverovatnije dovodi do modulacije specifičnog humoralnog i mukoznog imuniteta.

5.3 Uticaj suplementacije sojem *L. helveticus* L10 na lipidni status i kardiovaskularni rizik

Suplementacija probiotskim sojevima može da dovede i do hipoholesterolemijskih efekata, što se može objasniti na više načina (Guo i sar, 2011). Najpre, produkti fermentacije probiotika inhibiraju aktivnost enzima uključenih u sintezu holesterola, smanjujući tako njegovu produkciju; zatim, enzim hidrolaza koga poseduju neke BMK, vrši dekonjugaciju žučnih soli do slobodnih žučnih kiselina u intestinalnom lumenu, interferirajući na taj način sa njihovom recirkulacijom. Ovaj proces posledično dovodi do ushodne regulacije procesa sinteze žučnih kiselina iz holesterola, čime se smanjuje njegov nivo u serumu. Dalje, probiotici inkorporiraju holesterol u svoje ćelijske membrane ili ćelijski zid, kako bi povećali otpornost na uslove sredine. Takođe, olakšavaju eliminaciju holesterola u feces. Pored toga, određene bakterije imaju sposobnost da vežu holesterol za sebe i tako inhibiraju njegovu ponovnu apsorpciju (Guo i sar, 2011, Lye i sar, 2010, Pereira i sar, 2003).

Ipak, nisu uočene značajne promene lipidnog statusa ni u jednoj grupi ispitanika. Nivo LDL-C je smanjen, dok su nivoi HDL-C i TGC blago povećani. Ovakvi rezultati su se generalno mogli očekivati, s obzirom na to da su učesnici studije bili mladi zdravi i aktivni ljudi kod kojih su parametri lipidnog profila u granicama referentnih vrednosti. Meta-analiza (Guo i sar, 2011), koja je zaključila da probiotici smanjuju nivo LDL-C i TC, obuhvatila je fizički neaktivne osobe

starosti 24-67 godina, sa normalnim ili granično normalnim vrednostima holesterola. Ipak, meta-analiza ne ukazuje na sposobnost BMK da utiču na nivo HDL-C i TGC (Guo i sar, 2011).

Pored parametara lipidnog statusa, vršena je i procena kardiovaskularnog rizika sportista, implementiranjem skale *Cardiovascular Risk Score* (CRS) (McMahan's i sar, 2005). Skala sa rasponom skorovanja od -2 do 31, povezuje kumulativne efekte promenljivih faktora rizika, kao što non-HDL-C, HDL-C, pušenje, hipertenzija, gojaznost i hiperglikemija sa mogućnošću predikcije pojave aterosklerotskih lezija na AA i CA. Preciznije rečeno, skor od 10 predviđa mogućnost od 10%, skor od 20 – 25% i skor od 30 – skoro 60% za postojanje aterosklerotskih promena na arterijama (McMahan's i sar, 2005). U ovoj studiji, preračunati skor za sportiste je na početku studije bio u rasponu od -1 do 13, dok je nakon završetka studije taj raspon bio od -2 do 14. To znači da su sportisti imali skor od 10% rizika od pojave značajnih aterosklerotskih lezija na arterijama i da je taj skor zadržan do kraja studije. Ovakvi rezultati su mogli da se očekuju, s obzirom na to da su u studijiučestvovala normalno uhranjene osobe sa normalnom glikemijom i krvnim pritiskom. Slični rezultati su dobijeni u nedavnom istraživanju (Dželajlija et al, 2016), gde je takođe utvrđen nizak kardiovaskularni rizik kod dece u Srbiji. Stoga, buduća istraživanja treba da ispituju hipoholesterolemijske efekte soja *L. helveticus* L10 u populaciji sa povišenim kardiovaskularnim rizikom, što bi moglo da se iskoristi kao podrška postojećoj terapiji dislipidemija.

5.4 Uticaj suplementacije sojem *L. helveticus* na oksidativni status i mehanizme anti-oksidativne zaštite

Tradicionalni faktori rizika za razvoj KVB uključuju starost, pol, hiperholestolemiju, arterijsku hipertenziju, dijabetes i pušenje. Noviji faktori rizika, kao što su nivo homocisteina, inflamatornih citokina, ox-LDL i LDL čestica male veličine, skoro su pridodati ovoj listi (Libby, 2001). Niska koncentracija HDL čestica u plazmi predstavlja jedan od najvažnijih faktora rizika za razvoj KVB (Miller i Miller, 1975). Naime, HDL čestice imaju sposobnost da deluju kao antioksidativni štit LDL česticima u uslovima povišenog oksidativnog stresa (Otocka-Kmieciak i Orłowska-Majdak, 2009). Povećana količina slobodnih radikala može izazvati oksidaciju LDL čestica. Uočeno je da se osetljivost LDL čestica na oksidaciju indukovanu bakrom povećava nakon trke maratonaca (Sánchez -Quesada i sar, 1998), što može trajati i do 4 dana (Liu i sar,

1999). Nakon intenzivne aerobne FA javlja se negativno naelektrisana frakcija LDL čestica (Sánchez-Quesada i sar, 1998), za koju je dokazano da je citotoksična i da izaziva inflamaciju u endotelnim ćelijama (De Castellarnau i sar, 2000). Ipak, Tomas i sar, 2002 i Heitkamp i sar, 2008 nisu uočili promene nakon FA. U skladu sa ovim nalazima, osetljivost LDL čestica prema bakrom indukovanoj oksidaciji se nije značajno promenila ni u jednoj grupi tokom studije. Ovi rezultati su se mogli očekivati, s obzirom da se ni ispitivani parametri oksidativnog stresa u LDL frakciji (MDA i TOS) nisu značajno izmenili.

Primećen je značajan pad aktivnosti PON1 u obe grupe ispitanika. Antioksidativna funkcija HDL čestice ostvaruje se enzimima koji su vezani za njihovu površinu: acetil hidrolaza faktora aktivacije trombocita (eng. *platelet activating factor acetylhydrolase* - PAF-AH), lecitin/holesterol acil transferaza (LCAT), a posebno enzimu PON1 (Brites i sar, 2006). Ipak, povećana produkcija slobodnih radikala može uzrokovati smanjenu aktivnost PON1. Naime, aktivni centar PON1 poseduje rezidue cisteina, čije sulfhidrilne grupe predstavljaju deo enzima koji je osetljiv na oksidaciju. Posledično, bilo koja promena u oksidativnom statusu može da rezultuje promenom u aktivnosti enzima (Kotur-Stevuljevic i sar, 2015). U tom smislu, pokazano je da je izlaganje PON1 oksidovanim fosfolipidima koji se nalaze u HDL i LDL česticama praćeno značajnim padom aktivnosti PON1 usled smanjenja tiolnih rezidua u enzimu (Otocka-Kmiecik i Orłowska-Majdak, 2009). Kako bi se obezbedilo objašnjenje za značajan pad PON1 aktivnosti u serumu, određeni su parametri oksidativnog stresa (MDA i TOS) i antioksidativne zaštite (TAS) u HDL frakciji. Zanimljiv rezultat je da je u probiotskoj grupi nivo TOS u HDL frakciji ostao nepromenjen, dok je MDA smanjen u serumu. Istovremeno, u placebo grupi nije došlo do značajnih promena. Ovi rezultati mogu se objasniti na više načina. Najpre, MDA je određen TBARS testom, koji se, uprkos jednostavnosti i ekonomičnosti, ne smatra najpreciznijim markerom oksidativnog stresa, s obzirom da i ostali aldehidi i lipidne materije reaguju sa tiobarbiturnom kiselinom (Grotto i sar, 2009). Drugo, nivo MDA ukazuje na stepen lipidne peroksidacije, ali ne i oksidativnog stresa *per se*. Drugim rečima, precizna slika oksidativnog stresa se može dobiti kroz određivanje niza markera, ili kroz integrisani pristup. U tom smislu, PAB predstavlja najprecizniji marker, jer istovremeno pruža mogućnost određivanja pro-oksidativnog opterećenja i anti-oksidativnog kapaciteta. Međutim, do promena ovog parametra nije došlo ni u jednoj grupi, što ukazuje da soj Lafti najverovatnije ne poseduje antioksidativna svojstva.

Ipak, drastičan pad aktivnosti PON1 tokom studije u obe grupe ispitanika je kontradiktoran sa većim brojem studija. Tako, kod odbojkašica dolazi do povećanja aktivnosti PON1 prema paraoksonu (Martinovic i sar, 2009), kao i kod fizički neaktivne populacije nakon uvođenja FA (Senti el al, 2003), dok sa druge strane postoje i studije koje pokazuju da FA nema uticaj na aktivnost PON1 (Tomas i sar, 2002; Martinovic i sar, 2011). Ipak, treba napomenuti da uticaj FA na aktivnost PON1 nije još uvek sasvim razjašnjen, a da se neslaganja u literaturi mogu pripisati različitom stepenu FA ispitivane populacije, dužini trajanja FA, ali pre svega postojanju PON1-192 polimorfizma. Naime, zanimljiva studija autora Tomas i sar, 2002 je utvrdila različito ponašanje aktivnosti PON1 kod nosilaca različitih izoformi PON1-192 nakon uključivanja umerene FA u populaciju koja je prethodno bila fizički neaktivna: kod QQ nosilaca je došlo do povećanja PON1 aktivnosti, dok je suprotan efekat uočen kod R nosilaca. Objasnjenje ovih nalaza se najverovatnije nalazi u većoj osetljivosti R alozima prema povećanim količinama slobodnih radikala nakon sesija intenzivnih treninga (Tomas i sar, 2002). Pošto mi nismo odredili PON1-192 genotipove ispitanika, možemo jedino da pretpostavimo da su većinu ispitanika činili nosioci R izoforme. Međutim, mala je verovatnoća da je ova pretpostavka ispravna, jer je učestalost R izoforme u srpskoj i ostalim evropskim populacijama samo 26% (Kotur-Stevuljević i sar, 2008). Pored toga, čini se da je sposobnost PON1 da održi aktivnost nakon povećanja oksidativnog stresa usled ponovljenih sesija FA zavisna od dužine treniranja. Autori Martinović i sar, 2011 su utvrdili da je potrebno 8-10 godina treniranja da bi PON1 dostigla maksimalnu aktivnost. Stoga možemo da pretpostavimo da ispitanici naše studije nisu razvili potpuni kapacitet PON1.

S obzirom na povezanost PON1 i HDL čestica, očekivala bi se povezanost aktivnosti PON1 sa nivoom HDL-C. Međutim, u ovoj studiji ta korelacija nije pokazana, što se može objasniti činjenicom da je PON1 vezana za mali deo (oko 10%) populacije HDL-C (James RW i Deakin SP, 2004). Stoga, postoji mala verovatnoća da ukupni HDL-C predstavlja dobar biomarker za mali deo HDL-C koji nosi PON1 i za aktivnost PON1 (Baralić, 2012). U sledećoj fazi studije trebalo bi odrediti subpopulaciju HDL čestica na kojima dominira PON aktivnost.

Nivo svih markera oksidativnog stresa (AOPP, MDA, TOS, PAB) bili su iznad referentnih vrednosti, kako na početku, tako i na kraju studije. Stoga, intenzivna FA dovodi do povećanja oksidativnog stresa i ispoljava kumulativne efekte na oksidaciju lipida i proteina, bar u ovoj specifičnoj grupi sportista. Pored toga, nivo parametara antioksidativnih zaštitnih

mehanizama, SOD i TAS, nalazili su se ispod referentnih vrednosti, što je najverovatnije posledica neodgovarajućeg unosa dijetarnih antioksidanasa. Ovi nalazi su u skladu sa prethodnim istraživanjima, koji su ukazali da sportisti često ne unose dovoljno antioksidanasa putem hrane, čime postaju osetljiviji na negativno dejstvo oksidativnog stresa (Margaritis i sar, 2003). Stoga, suplementacija antioksidansima u periodima intenzivnih treninga i takmičenja može imati povoljan efekat na smanjenje oksidativnog stresa kod sportista. Ipak, pre početka suplementacije treba proceniti unos antioksidanasa na osnovu dnevnika ishrane, a zatim i sagledati zdravstveno stanje i performanse sportiste, i tek onda odlučiti da li je antioksidantna suplementacija potrebna. Takođe, ne preporučuje se unos antioksidanasa u dozama nekoliko desetina puta većim od RDA vrednosti, jer postoji mogućnost da antioksidansi u velikoj količini u organizmu postaju pro-oksidansi. Naime, velike doze antioksidanasa suzbijaju važne fiziološke aktivnosti slobodnih radikala, kao što su: ushodna regulacija ekspresije i povećanje aktivnosti antioksidativnih enzima, povećana efikasnost reparacije DNK i biosinteze mitohondrija, opravak mišića nakon povrede i dr. (Peternelj i Coombes, 2011).

Postoje studije koje čak ukazuju i na štetnost antioksidantne suplementacije u sportskoj populaciji. Tako, visoke doze antioksidanasa mogu dovesti do povećanog oksidativnog stresa. Suplementacija koenzimom Q₁₀ je povezana sa porastom nivoa keratin-kinaze, markera ćelijskog oštećenja i smanjenjem fizičkih performansi (Malm i sar, 1997). Međutim, zanimljivi su rezultati studije koja se bavila efektima pojedinačne i istovremene suplementacije vitaminima C i E (Bryant i sar, 2003). Naime, suplementacija vitaminom E dovela je do smanjenja nivoa MDA, konzumacija vitamina C je pokazala suprotan efekat, dok kombinovana suplementacija ova 2 vitamina nije dovela do promene MDA. Ovi rezultati ukazuju na značaj liposolubilnosti, tj. hidrosolubilnosti vitamina u ispoljavanju antioksidantnih efekata. Ipak, kombinovana suplementacija vitaminom E i C 6 nedelja pre i 2 dana nakon izvođenja 90-minutnog testa pod nazivom *Loughbour intermittent shuttle run*, koji obuhvata sesije trčanja različitog intenziteta, dovela je do povećanja markera oksidativnog stresa i inflamacije u interventnoj grupi u odnosu na placebo (Bailey i sar, 2011). Dalje, suplementacija triatlonaca visokim dozama vitamina E (800 IU) tokom 2 meseca nije imala efekta na vreme završetka trke, ali je dovela do povećanja lipidne peroksidacije i markera inflamacije (F2-izoprostana, IL-6, IL-8, IL1ra) (Nieman i sar, 2004). Knez i sar, 2007 je pokazao da intenzivno treniranje triatlonaca uzrokuje ushodnu regulaciju nekoliko antioksidantnih enzima (GPX, CAT, SOD) i smanjenje parametara

oksidativnog stresa u stanju mirovanja, dok suplementacija vitaminima C i E nije imala uticaja na ove parametre. Randomizovana dvostruko-slepa *cross-over* studija je ukazala na slične rezultate, gde je suplementacija multikomponentnim antioksidantnim proizvodom (vitamini E, C, β -karoten i selen) bila povezana sa povećanjem stepena lipidne peroksidacije i smanjenog nivoa GPX nakon ergometrijskog testa u odnosu na vrednosti pre izvođenja testa (Lamprecht i sar, 2009).

Ipak, nedostatak ovog dela istraživanja je određivanje relativno malog broja antioksidanasa u serumu. Detaljnija slika oksidativnog statusa i antioksidativne zaštite bila bi obezbeđena određivanjem većeg broja parametara, npr. nivoa glutaciona, alfa-liponske kiseline, koenzima Q-10, vitamina C, A i E i karotenoida.

Dakle, na osnovu iznetih rezultata, potrebno je da se u budućim istraživanjima ispita antioksidantni potencijal soja Lafti, iako se trenutno čini da je on prilično zanemarljiv. I pored velikog broja istraživanja koja su se bavila tematikom uticaja intenzivne FA na oksidativni stres, još uvek postoje sukob mišljenja oko antioksidativne suplementacije. S obzirom da vrhunski sportisti mogu imati veće potrebe tokom intenzivnih treninga za unosom antioksidanasa, dijetarni antioksidansi predstavljaju važnu dodatnu zaštitu protiv oksidativnog stresa, ali ukoliko se unose u količinama koje odgovaraju preporučenim vrednostima i dijetarne izvore.

5.5 Uticaj soja *L. helveticus* na raspoloženje i sportske performanse

Vrhunski sportisti se nalaze pod konstantnim fizičkim i psihološkim stresom, koji mogu dovesti do oštećenja imuniteta i povećane incidence respiratornih infekcija (Talbot i Talbot, 2009; Fondell i sar, 2011). Naime, uočeno je da psihološki stres može prouzrokovati oštećenje citokinskog odgovora i produkcije antitela (Cohen i sar., 1999). Jedan od najčešće korišćenih upitnika za procenu psihološkog stanja sportista je POMS, anketa koja se sastoji od niza od 65 stanja raspoloženja i osećanja, koje ispitanici ocenjuju Likertovom skalom od 5 gradacijskih stupnjeva. Utvrđeno je da nakon trke kod maratonaca dolazi da značajnog pada raspoloženja, dok istovremeno raste osećaj umora; slični rezultati su zabeleženi i kod ostalih sportista nakon perioda intenzivnih treninga (Hassmen i Blomstrand, 1991; Achten i sar., 2004). U ovoj studiji je zabeleženo povećanje subjektivnog osećaja snage u probiotskoj grupi, iako nije utvrđena značajna razlika u rezultatima koji se odnose na skorove za stanje anksioznosti, depresije,

borbenosti, konfuznosti, zamora, kao i totalnog osećaja uznemirenosti. Stoga, poboljšanje subjektivnog osećaja snage u probiotskoj grupi može biti povezano sa ukupnim unapređenjem zdravlja, ali možda predstavlja prvi dokaz da soj *L. helveticus* poseduje sposobnost modulacije tzv. ose mozak-GIT. Međutim, ova studija je obuhvatila relativno mali broj ispitanika, a pritom ovo su jedini rezultati koji ukazuju na sposobnost soja *L. helveticus* L10 da vrši modulaciju raspoloženja sportista. Stoga, ovakvom tumačenju rezultata pristupamo vrlo oprezno, ali svakako vredi ispitati ove efekte u budućim studijama.

Naime, mozak i GIT su neurološkim, endokrinim i imunološkim putevima povezani i čine osu mozak-GIT (eng. *brain-gut axis*) (Grossman, 1979; Mayer, 2011; Steenbergen i sar, 2015). Poslednjih nekoliko godina je otkriveno da GI mikrobiota proizvodi različite signalne molekule, koji pored toga što pokazuju imunološko dejstvo, mogu da utiču i na ponašanje (Mayer, 2011; Foster i McVey Neufeld, 2013; McCusker i Kelley, 2013). Tako, mikrobiota produkuje neuroaktivne susptance, ili njihove prekursore, npr. serotonin, koji dospevaju do centralnog nervnog sistema (CNS) endokrinim putem ili aferentnim autonomnim vlaknima (Desbonnet i sar, 2008; Desbonnet i sar, 2010). Takođe, bakterijski produkti, kao što je endotoksin Gram- bakterija, mogu uticati na raspoloženje i kognitivne funkcije indirektno, npr. modifikovanjem citokinskog profila (od posebnog značaja su TNF- α , IL-1 β , IL-6, IFN), ili direktno, npr. aktivacijom TLR ili glijalnih ćelija (McCusker i Kelley, 2013; Steenbergen i sar, 2015). Efekti probiotskih sojeva na ponašanje su ispitivani pre svega u animalnim studijama, dok su humane studije prilično retke. Ipak, njihovi rezultati su obećavajući. Tako, uočeno je da primena određenih probiotskih sojeva može da popravi raspoloženje ispitanika sa pojačanim simptomima depresije, a neki efekti su se čak mogli porediti sa efektom antidepresiva citaloprama (Desbonnet i sar., 2010). Vrlo zanimljivi su rezultati kliničke studije sprovedene na sportistima na univerzitetu i dizajna sličnog našem, koja je primenila POMS upitnik u svrhu procene uticaja suplementacije sojem *L. gasseri* na stanje raspoloženja ispitanika (Sashihara, i sar, 2013). Suplementacija je uzrokovala smanjenje subjektivnog osećaja umora i popravila skor vezan za osećaj depresije, što je praćeno smanjenjem nivoa TGF β 1 i reaktivnih oksidativnih metabolita (eng. *Reactive Oxygen Metabolites*, ROM).

U ovoj studiji nije zabeležena promena sportskih performansi, tj. nije došlo do promene nivoa VO₂max, kao ni ostalih parametara kardiopulmonalnog testa. Ovakvi rezultati su u saglasnosti sa većinom studija sličnog dizajna (Cox i sar, 2010; Gleeson i sar, 2011; West i sar,

2011; Gleeson i sar, 2012; Lamprecht i sar, 2012). Međutim, do sada su, prema našim saznanjima, objavljene 2 publikacije koje ukazuju na ergogena svojstva probiotskih sojeva. Suplementacija multikomponentnog probiotskog proizvoda dovela je do umerenog produženja perioda treniranja do pojave umora u uslovima visoke temperature, što je praćeno blagim smanjenjem GIT permeabilnosti i tegoba u odnosu na placebo grupu (Shing i sar., 2014). Ipak, najzanimljiviji su rezultati *cross-over* studije koji su pokazali da istovremena konzumacija kazeina i soja *Bacillus coagulans* smanjuje oštećenje mišića, kao i da održava sportske performanse nakon „*Wingate* testa“ u odnosu na grupu koja je konzumirala samo kazein (Jäger i sar, 2016). Ovi rezultati ukazuju na sposobnost određenih probiotskih sojeva da povećaju bioraspoloživost proteina, usled produkcije digestivnih enzima, koji se aktiviraju u uslovima koji vladaju u crevima (Matthuis i sar, 2010). Pilot studija je pokazala da ove proteaze *in vitro* vrše digestiju proteina efikasnije od endogenih humanih proteaza (Minevich i sar, 2015). Inače, povećanje iskoristljivosti proteina nakon treninga pospešuje oporavak i razvoj mišićne mase (Campbell i sar, 2007).

Rezultati ove studije ukazuju da suplementacija sojem *L. helveticus* L10 ne dovodi do promene sportskih performansi. Međutim, ovo je prva studija koja ukazuje na moguće pozitivne efekte ovog soja na raspoloženje, tj. da povećava subjektivni osećaj snage, što se neophodno mora potvrditi u budućim studijama.

6 Zaključci

U skladu sa postavljenim ciljevima, na osnovu rezultata studije zaključuje se sledeće:

1. Suplementacija sojem *L. helveticus* L10 ne dovodi do smanjenja učestalosti infekcija gornjeg respiratornog trakta, kao i težine respiratornih simptoma tokom 14 nedelja zimskog perioda. Ipak, uzrokuje skraćenje trajanja epizode respiratornih infekcija, kao i broj respiratornih simptoma koji se javljaju tokom trajanja epizode.
2. Intenzivni treninzi tokom 14 nedelja zimske sezone ispoljavaju supresivan kumulativni efekat na mukozni sistem, izazivajući značajan pad sIgA antitela. Suplementacija sojem *L. helveticus* L10 pak pomaže u održanju nivoa mukoznog imuniteta sprečavajući značajan pad koncentracije sIgA antitela, što je najverovatnije uzrok skraćenja trajanja infekcija gornjeg respiratornog trakta. Sa druge strane, suplementacija ne utiče na nivo specifičnih sIgA antitela protiv određenih laktobacilusa.
3. Suplementacija sojem *L. helveticus* L10 sprečava značajan pad koncentracije IgA antitela u serumu, ukazujući na sposobnost modulacije humoralnog imuniteta. Ipak, suplementacija najverovatnije dovodi do indukcije specifičnog humoralnog odgovora, tj. do održanja nivoa serumskog IgA antitela specifičnog za dva testirana soja LAB (*L. rhamnosus* LA68 i LB 64), i specifičnog IgG antitela protiv *E. faecalis*. Stoga, buduća istraživanja treba da ispitaju specifični humoralni odgovor na veći broj izazivača respiratornih infekcija, u cilju obezbeđivanja kvalitetnih dokaza o efikasnosti soja Lafti u skraćanju respiratornih infekcija. Intenzivna FA tokom sezone za vreme zime utiče na određene aspekte humoralnog imuniteta: dovodi do smanjenja koncentracije ukupnih IgA antitela u serumu, zatim uzorkuje značajan porast IgM antitela. Suprotno tome, ne utiče na nivo ukupnih IgG antitela.
4. Suplementacija sojem *L. helveticus* L10 dovodi do smanjenja MDA u serumu. Ipak, soj Lafti najverovatnije ne poseduje antioksidantna svojstva, s obzirom na to da ne utiče na parametre oksidativnog statusa (TOS, PAB, AOPP), kao ni na parametre antioksidantne zaštite (PON1, SOD, TAS).

5. Zabeleženi su visoki nivoi markera oksidativnog stresa (AOPP, MDA, TOS, PAB) i niske koncentracije parametara antioksidativnih zaštitnih mehanizama (SOD i TAS) u odnosu na referentne vrednosti u obe grupe pre, ali i nakon studije. Ovi rezultati ukazuju na to da intenzivna FA, najverovatnije usled neodgovarajućeg unosa dijetarnih antioksidanasa, dovodi do povećanja oksidativnog stresa, bar u ovoj specifičnoj grupi vrhunskih sportista. Stoga, antioksidantna suplementacija može biti od posebnog interesa za vrhunske sportiste u periodima intenzivnih treninga, naročito ukoliko je unos antioksidanasa kroz redovnu ishranu nizak.

6. Suplementacija sojem *L. helveticus* L10 ne ispoljava efekte na markere lipidnog statusa (LDL-C, HDL-C, TC i TGC) i ostale konvencionalne biohemijske parametre (glukoza, albumin, bilirubin, mokraćna kiselina).

7. Suplementacija sojem *L. helveticus* L10 ne dovodi do promene sporstkih performansi, tj. promene VO_{2max} , kao ni ostalih parametara ergospirometrijskih ispitivanja. Takođe, ne utiče na telesni sastav sportista, kao ni na njihove antropometrijske mere.

8. Suplementacija sojem *L. helveticus* L10 uzrokuje poboljšanje subjektivnog osećaja snage, što može biti povezano sa ukupnim unapređenjem zdravlja, ali možda predstavlja prvi dokaz modulacije tzv. ose mozak-GIT. S obzirom da je ova studija obuhvatila relativno mali broj ispitanika i da su ovo jedini rezultati koji ukazuju na sposobnost soja *L. helveticus* L10 da vrši modulaciju raspoloženja sportista, ovakvom tumačenju rezultata se pristupa vrlo oprezno. Ovaj efekat mora da se ispita u budućim studijama sa većim brojem ispitanika.

7 Literatura

Achten, J., Halson, S. L., Moseley, L., et al. (2004). Higher dietary carbohydrate content during intensified running training results in better maintenance of performance and mood state. *Journal of Applied Physiology*, 96(4), 1331-1340.

Abbasi, A., Fehrenbach, E., Hauth, M., et al. (2013). Changes in spontaneous and LPS-induced ex vivo cytokine production and mRNA expression in male and female athletes following prolonged exhaustive exercise. *Exercise immunology review*, 19, 8-28.

Ainsworth, B. E., Haskell, W. L., Herrmann, S. D., et al. (2011). Compendium of Physical Activities: a second update of codes and MET values. *Medicine and science in sports and exercise*, 43(8), 1575-1581.

Alamdari, D. H., Paletas, K., Pegiou, T., et al. (2007). A novel assay for the evaluation of the prooxidant–antioxidant balance, before and after antioxidant vitamin administration in type II diabetes patients. *Clinical biochemistry*, 40(3), 248-254.

Alberda, C., Gramlich, L., Meddings, J., et al. (2007). Effects of probiotic therapy in critically ill patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *The American journal of clinical nutrition*, 85(3), 816-823.

Albers, R., Antoine, J. M., Bourdet-Sicard, R., et al. (2005). Markers to measure immunomodulation in human nutrition intervention studies. *British Journal of Nutrition*, 94(03), 452-481.

Baggiolini M and Clark-Lewis I (1992). Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett.* 307 (1): 97–101.

Bailey, D. M., Williams, C., Betts, J. A., et al. (2011). Oxidative stress, inflammation and recovery of muscle function after damaging exercise: effect of 6-week mixed antioxidant supplementation. *European journal of applied physiology*, 111(6), 925-936.

- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., et al. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annual review of immunology*, 18(1), 767-811.
- Baralić, I. Uticaj suplementacije astaksantinom na nivo markera oksidativnog stresa i nivo sekretornog IgA u salivi kod mladih fudbalera. Doktorska disertacija, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu, 2007.
- Barrett, B., Locken, K., Maberry, R., et al. (2002). The Wisconsin upper respiratory symptom survey (WURSS). *Journal of Family Practice*, 51(3), 265-265.
- Bellone, G., Aste-Amezaga, M., Trinchieri, G., et al. (1995). Regulation of NK cell functions by TGF-beta 1. *The Journal of Immunology*, 155(3), 1066-1073.
- Bergman, E. N. (1990). Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiological reviews*, 70(2), 567-590.
- Bishop, N. C., Walker, G. J., Scanlon, G. A., et al. (2006). Salivary IgA responses to prolonged intensive exercise following caffeine ingestion. *Medicine and science in sports and exercise*, 38(3), 513-519.
- Borchers, A. T., Selmi, C., Meyers, F. J., et al. (2009). Probiotics and immunity. *Journal of gastroenterology*, 44(1), 26-46.
- Bosch, J. A., Ring, C., de Geus, E. J., et al. (2002). Stress and secretory immunity. *International review of neurobiology*, 52, 213-253.
- Brites, F., Zago, V., Verona, J., et al. (2006). HDL capacity to inhibit LDL oxidation in well-trained triathletes. *Life sciences*, 78(26), 3074-3081.
- Brown, G. D. and Gordon, S. (2003). Fungal beta-glucans and mammalian immunity. *Immunity*, 19, 311-315.
- Bryant, R. J., Ryder, J., Martino, P., et al. (2003). Effects of vitamin E and C supplementation either alone or in combination on exercise-induced lipid peroxidation in trained cyclists. *The Journal of Strength and Conditioning Research*, 17(4), 792-800.

Cabellero, B. (2004). Principals of human nutrition. Seminar offerd by John Hopkins, Bloomberg School oh public health.

Calder, P. C., and Yaqoob, P. (Eds.). (2013). *Diet, immunity and inflammation*. Elsevier.

Campbell B., Kreider R. B., Ziegenfuss T., et al. (2007). International society of sports nutrition position stand: protein and exercise. *Journal of the International Society of Sports Nutrition* 4:8.

Campbell, P. T., Wener, M. H., Sorensen, B., et al. (2008). Effect of exercise on in vitro immune function: a 12-month randomized, controlled trial among postmenopausal women. *Journal of Applied Physiology*, 104(6), 1648-1655.

Cani, P. D., Neyrinck, A. M., Fava, F., et al. (2007). Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia*, 50(11), 2374-2383.

Cebra, J. J., Periwai, S. B., Lee, G., et al. (1998). Development and maintenance of the gut-associated lymphoid tissue (GALT): the roles of enteric bacteria and viruses. *Journal of Immunology Research*, 6(1-2), 13-18.

Ceddia, M. A., Voss, E. W., and Woods, J. A. (2000). Intracellular mechanisms responsible for exercise-induced suppression of macrophage antigen presentation. *Journal of applied physiology*, 88(2), 804-810.

Chakravarti, A. (1995). The CD4/CD8 ratio: Message in a bottle?. *Nature medicine*, 1(12), 1240-1241.

Chao, C. C., Hu, S., Tsang, M., et al. (1992). Effects of transforming growth factor-beta on murine astrocyte glutamine synthetase activity. Implications in neuronal injury. *Journal of Clinical Investigation*, 90(5), 1786.

Chiang, L. M., Chen, Y. J., Chiang, J., et al. (2007). Modulation of dendritic cells by endurance training. *International journal of sports medicine*, 28(09), 798-803.

Chicharro, J. L., Lucía, A., Pérez, M., et al. (1998). Saliva composition and exercise. *Sports medicine*, 26(1), 17-27.

- Choi, J. J., Eum, S. Y., Rampersaud, E., et al. (2013). Exercise attenuates PCB-induced changes in the mouse gut microbiome. *Environmental health perspectives*, 121(6), 725.
- Christensen, H. R., Frøkiær, H., and Pestka, J. J. (2002). Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *The journal of immunology*, 168(1), 171-178.
- Clancy, R. L., Gleeson, M., Cox, A., et al. (2006). Reversal in fatigued athletes of a defect in interferon γ secretion after administration of *Lactobacillus acidophilus*. *British journal of sports medicine*, 40(4), 351-354.
- Clarke, S. F., Murphy, E. F., O'Sullivan, O., et al. (2014). Exercise and associated dietary extremes impact on gut microbial diversity. *Gut*, gutjnl-2013.
- Close, D. C., Hagerman, A. E., Wiley, R. L., et al. (2006). Chemistry of reactive oxygen species and antioxidants. *Oxidative stress, exercise and aging*. Imperial College Press, London, 1-8.
- Cohen S., Doyle W. J., and Skoner D. P. (1999) Psychological stress, cytokine production, and severity of upper respiratory illness. *Psychosomatic medicine* 61, 175-18.
- Cox, A. J., Pyne, D. B., Saunders, P. U., et al. (2010). Oral administration of the probiotic *Lactobacillus fermentum* VRI-003 and mucosal immunity in endurance athletes. *British journal of sports medicine*, 44(4), 222-6.
- Cox, A. J., West, N. P., Horn, P. L., et al. (2014). Effects of probiotic supplementation over 5 months on routine haematology and clinical chemistry measures in healthy active adults. *European journal of clinical nutrition*, 68(11), 1255-1257.
- Crago, S. S., Kutteh, W. H., Moro, I., et al. (1984). Distribution of IgA1-, IgA2-, and J chain-containing cells in human tissues. *The journal of immunology*, 132(1), 16-18.
- Crary, B., Hauser, S. L., Borysenko, M., et al. (1983). Epinephrine-induced changes in the distribution of lymphocyte subsets in peripheral blood of humans. *The journal of immunology*, 131(3), 1178-1181.

- Crooks, C. V., Wall, C. R., Cross, M. L., et al. (2006). The effect of bovine colostrum supplementation on salivary IgA in distance runners. *International journal of sport nutrition and exercise metabolism*, 16(1), 47.
- Czarkowska-Paczek, B., Bartłomiejczyk, I., and Przybylski, J. (2006). The serum levels of growth factors: PDGF, TGF-BETA. *Journal of Physiol Pharmacol*, 57, 189-97.
- Daele, J., and Zicot, A. F. (1999). Humoral immunodeficiency in recurrent upper respiratory tract infections. Some basic, clinical and therapeutic features. *Acta oto-rhino-laryngologica belgica*, 54(3), 373-390.
- Davis, J. M., Murphy, E. A., Brown, A. S., et al. (2004). Effects of oat beta-glucan on innate immunity and infection after exercise stress. *Medicine and science in sports and exercise*, 36(8), 1321-1327.
- Davison, G., and Diment, B. C. (2010). Bovine colostrum supplementation attenuates the decrease of salivary lysozyme and enhances the recovery of neutrophil function after prolonged exercise. *British journal of nutrition*, 103(10), 1425-1432.
- Davison, G., and Gleeson, M. (2006). The effect of 2 weeks vitamin C supplementation on immunoendocrine responses to 2.5 h cycling exercise in man. *European journal of applied physiology*, 97(4), 454-461.
- De Castellarnau, C., Sánchez-Quesada, J. L., Benítez, S., et al. (2000). Electronegative LDL from normolipemic subjects induces IL-8 and monocyte chemotactic protein secretion by human endothelial cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 20(10), 2281-2287.
- De Moreno de LeBlanc, A., Chaves, S., Carmuega, E., et al. (2008). Effect of longterm continuous consumption of fermented milk containing probiotic bacteria on mucosal immunity and the activity of peritoneal macrophages. *Immunobiology*, 213, 97-108.
- De Smet, K., and Contreras, R. (2005). Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnology letters*, 27(18), 1337-1347.

de Vrese M, Winkler P, Rautenberg P, et al. (2005) Effect of *Lactobacillus gasseri* PA 16/8, *Bifidobacterium longum* SP 07/3, *B. bifidum* MF 20/5 on common cold episodes: a double blind, randomized, controlled trial. *Clinical nutrition*, 24, 481–491.

Deaton, C. M., and Marlin, D. J. (2003). Exercise-associated oxidative stress. *Clinical Techniques in Equine Practice*, 2(3), 278-291.

Delcenserie, V., Martel, D., Lamoureux, M., et al. (2008). Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract. *Current issues in molecular biology*, 10(1/2), 37.

de Oliveira, E. P., and Burini, R. C. (2011). Food-dependent, exercise-induced gastrointestinal distress. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 8(1), 1.

Derrien, M., and van Hylckama Vlieg, J. E. (2015). Fate, activity, and impact of ingested bacteria within the human gut microbiota. *Trends in microbiology*, 23(6), 354-366.

Desbonnet, L., Garrett, L., Clarke, G., et al. (2008). The probiotic *Bifidobacteria infantis*: an assessment of potential antidepressant properties in the rat. *Journal of psychiatric research*, 43(2), 164-174.

Desbonnet, L., Garrett, L., Clarke, G., Kiely, B., Cryan, J.F., Dinan, T.G., (2010). Effects of the probiotic *Bifidobacterium infantis* in the maternal separation model of depression. *Neuroscience*, 170(4), 1179–1188.

Di Giacinto, C., Marinaro, M., Sanchez, M., et al. (2005). Probiotics ameliorate recurrent Th1-mediated murine colitis by inducing IL-10 and IL-10-dependent TGF- β -bearing regulatory cells. *The journal of immunology*, 174(6), 3237-3246.

Dong, H., Rowland, I. and Yaqoob, P. (2012) Comparative effects of six probiotic strains on immune function in vitro. *British journal of nutrition*, 108, 459–470.

Douglas, R. M., and Hemilä, H. (2005). Vitamin C for preventing and treating the common cold. *PLoS Med*, 2(6), e168.

Dietary Reference Intakes (DRIs): Estimated Average Requirements. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, National Academies

- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*, 82(1), 47-95.
- Duerkop, B. A., Vaishnava, S., and Hooper, L. V. (2009). Immune responses to the microbiota at the intestinal mucosal surface. *Immunity*, 31(3), 368-376.
- Dwivedi, M., Kumar, P., Laddha, N. C., et al. (2016). Induction of regulatory T cells: A role for probiotics and prebiotics to suppress autoimmunity. *Autoimmunity reviews*, 15(4), 379-392.
- Dželajlija, D. D., Spasić, S. S., Kotur-Stevuljevic, J. M., et al. (2016). Cardiovascular Risk Factors in 7–13 Years Old Children from Vojvodina (Serbia). *Journal of medical biochemistry*
- Eberhardt A. (1971). Influence of motor activity on some serologic mechanisms of nonspecific immunity of the organism. *Acta Physiologica Polonica*, 22: 201-212.
- Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., et al. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *science*, 308(5728), 1635-1638.
- Panel, E. B. (2013). Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2013 update). *EFSA Journal*, 11(11), 3449.
- Enss, M. L., Grosse-Siestrup, H., Schmidt-Wittig, U., et al. (1992). Changes in colonic mucins of germfree rats in response to the introduction of a "normal" rat microbial flora. Rat colonic mucin. *Journal of experimental animal science*, 35(3), 110-119.
- Erel, O. (2004). A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clinical biochemistry*, 37(2), 112-119.
- Erel, O. (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical biochemistry*, 38(12), 1103-1111.
- Evans, C. C., LePard, K. J., Kwak, J. W., et al. (2014). Exercise prevents weight gain and alters the gut microbiota in a mouse model of high fat diet-induced obesity. *PloS one*, 9(3), e92193.
- Fahlman, M. M., Engels, H. J., Morgan, A. L., et al. (2001). Mucosal IgA response to repeated wingate tests in females. *International journal of sports medicine*, 22(02), 127-131.

- Fang, H., Elina, T., Heikki, A., et al. (2000). Modulation of humoral immune response through probiotic intake. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 29(1), 47-52.
- Hotel, A. C. P. (2001). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. *Prevention*, 5(1).
- Feleszko, W., Jaworska, J., Rha, R. D., et al. (2007). Probiotic-induced suppression of allergic sensitization and airway inflammation is associated with an increase of T regulatory-dependent mechanisms in a murine model of asthma. *Clinical and Experimental Allergy*, 37(4), 498-505.
- Felis, G. E., and Dellaglio, F. (2007). Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *Current issues in intestinal microbiology*, 8(2), 44.
- Ferré, N., Camps, J., Fernández-Ballart, J., et al. (2003). Regulation of serum paraoxonase activity by genetic, nutritional, and lifestyle factors in the general population. *Clinical Chemistry*, 49(9), 1491-1497.
- Field, C. J., Gougeon, R. and Marliss, E. B. (1991). Circulating mononuclear cell numbers and function during intense exercise and recovery. *Journal of applied physiology*, 71(3), 1089-1097.
- Fijan, S. (2014). Microorganisms with claimed probiotic properties: an overview of recent literature. *International journal of environmental research and public health*, 11(5), 4745-4767.
- Finaud J., Lac G., and Filaire L. (2006). Oxidative stress - relationship with exercise and training. *Sports Medicine*, 36, 327-358.
- Fischer, C. P., Hiscock, N. J., Penkowa, M., et al. (2004). Supplementation with vitamins C and E inhibits the release of interleukin-6 from contracting human skeletal muscle. *The journal of physiology*, 558(2), 633-645.
- Fisher-Wellman, K., and Bloomer, R. J. (2009). Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dynamic Medicine*, 8(1), 1.
- Fitzpatrick, L. R., Small, J., Hoerr, R. A., et al. (2008). In vitro and in vivo effects of the probiotic *Escherichia coli* strain M-17: immunomodulation and attenuation of murine colitis. *British journal of nutrition*, 100(03), 530-541.

Flint, H. J. (2012). The impact of nutrition on the human microbiome. *Nutrition reviews*, 70(suppl 1), S10-S13.

Flynn, M. G., McFarlin, B. K., Phillips, M. D., et al. (2003). Toll-like receptor 4 and CD14 mRNA expression are lower in resistive exercise-trained elderly women. *Journal of applied physiology*, 95(5), 1833-1842.

Fondell, E., Lagerros, Y. T., Sundberg, C. J., et al. (2011). Physical activity, stress, and self-reported upper respiratory tract infection. *Medicine and science in sports and exercise*, 43(2), 272-279.

Forrest, B. D. (1992). Indirect measurement of intestinal immune responses to an orally administered attenuated bacterial vaccine. *Infection and immunity*, 60(5), 2023-2029.

Fortes, M. B., Diment, B. C., Di Felice, U., and Walsh, N. P. (2012). Dehydration decreases saliva antimicrobial proteins important for mucosal immunity. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 37(5), 850-859.

Foster, J. A., and Neufeld, K. (2013). Gut–brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. *Trends in neurosciences*, 36(5), 305-312.

French, M. A., and Harrison, G. (1984). Serum IgG subclass concentrations in healthy adults: a study using monoclonal antisera. *Clinical and experimental immunology*, 56(2), 473.

Fritz, J.H.; Rojas, O.L.; Simard, N.; et al. (2012). Acquisition of a multifunctional IgA+ plasma cell phenotype in the gut. *Nature*, 481, 199–203.

Fry, R. W., Morton, A. R., Crawford, G. P. M., et al. (1992). Cell numbers and in vitro responses of leucocytes and lymphocyte subpopulations following maximal exercise and interval training sessions of different intensities. *European journal of applied physiology and occupational physiology*, 64(3), 218-227.

Galdeano, C. M., de LeBlanc, A. D. M., Vinderola, G., et al. (2007). Proposed model: mechanisms of immunomodulation induced by probiotic bacteria. *Clinical and vaccine immunology*, 14(5), 485-492.

- Gavin, T. P., Spector, D. A., Wagner, H., et al. (2000). Effect of captopril on skeletal muscle angiogenic growth factor responses to exercise. *Journal of Applied Physiology*, 88(5), 1690-1697.
- Giahi, L., Aumueller, E., Elmadfa, I., et al (2012). Regulation of TLR4, p38 MAPkinase, IκB and miRNAs by inactivated strains of lactobacilli in human dendritic cells. *Beneficial microbes*, 3(2), 91-98.
- Gill, H. S., Rutherford, K. J., and Cross, M. L. (2001). Dietary probiotic supplementation enhances natural killer cell activity in the elderly: an investigation of age-related immunological changes. *Journal of clinical immunology*, 21(4), 264-271.
- Gill, S. K., Allerton, D. M., and Ansley-Robson, P. (2016). Does short-term high dose probiotic supplementation containing *Lactobacillus casei* attenuate exertional-heat stress induced endotoxaemia and cytokinaemia? *International journal of sport nutrition and exercise metabolism*, 26(3).
- Gill, S. K., Cox, M., Maria Teixeira, A., et al. (2016). High-Dose Probiotic Supplementation Containing *Lactobacillus casei* for 7 Days Does Not Enhance Salivary Antimicrobial Protein Responses to Exertional Heat Stress Compared With Placebo. *International journal of sport nutrition and exercise metabolism*, 26(2).
- Girotti, M. J., Khan, N., and McLellan, B. A. (1991). Early measurement of systemic lipid peroxidation products in the plasma of major blunt trauma patients. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 31(1), 32-35.
- Gleeson, M., McDonald, W. A., Cripps, A. W., et al. (1995). The effect on immunity of long-term intensive training in elite swimmers. *Clinical and Experimental Immunology*, 102(1), 210-216.
- Gleeson, M., McDonald, W. A., Pyne, D. B., et al. (1999). Salivary IgA levels and infection risk in elite swimmers. *Medicine and science in sports and exercise*, 31, 67-73.
- Gleeson, M., and Bishop, N. C. (2005). The T cell and NK cell immune response to exercise. *Annals of transplantation*, 10(4), 44.

- Gleeson, M., Bishop, N., Oliveira, M., et al. (2011). Daily probiotic's (Lactobacillus casei Shirota) reduction of infection incidence in athletes. *International journal of sport nutrition and exercise metabolism*, 21(1), 55-64.
- Gleeson, M., Bishop, N. C., Oliveira, M., et al. (2012). Effects of a Lactobacillus salivarius probiotic intervention on infection, cold symptom duration and severity, and mucosal immunity in endurance athletes. *International journal of sport nutrition and exercise metabolism*, 22(4), 235-242.
- Gleeson, M., and Bishop, N. C. (2013). URI in athletes: are mucosal immunity and cytokine responses key risk factors?. *Exercise and sport sciences reviews*, 41(3), 148-153.
- Gleeson, M., Bishop, N., Oliveira, M., et al. (2013). Influence of training load on upper respiratory tract infection incidence and antigen-stimulated cytokine production. *Scandinavian journal of medicine and science in sports*, 23(4), 451-457.
- Gleeson M. Immunological aspects of sport nutrition. (2016). *Immunology and Cell Biology*, 94, 117–123.
- Gleeson, M., and Pyne, D. B. (2016). Respiratory inflammation and infections in high-performance athletes. *Immunology and cell biology*, 94(2), 124-131.
- Gleeson, M., Bishop, N. C., and Struszczyk, L. (2016). Effects of Lactobacillus casei. *European journal of applied physiology*, 116(8), 1555-1563.
- Grossman, M. I. (1979). Neural and hormonal regulation of gastrointestinal function: an overview. *Annual review of physiology*, 41(1), 27-27.
- Grotto, D., Maria, L. S., Valentini, J., et al. (2009). Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. *Química nova*, 32(1):169-174.
- Guerci, B., Antebi, H., Meyer, L., et al. (1999). Increased ability of LDL from normolipidemic type 2 diabetic women to generate peroxides. *Clinical chemistry*, 45(9), 1439-1448.

Guillemard, E., Tondu, F., Lacoïn, F., et al. (2010). Consumption of a fermented dairy product containing the probiotic *Lactobacillus casei* DN-114001 reduces the duration of respiratory infections in the elderly in a randomised controlled trial. *British journal of nutrition*, 103:58–68.

Guo, Z., Liu, X. M., Zhang, Q. X., et al. (2011). Influence of consumption of probiotics on the plasma lipid profile: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Nutrition, metabolism and cardiovascular diseases*, 21(11), 844-850.

Halson, S. L., Lancaster, G. I., Achten, J., et al. (2004). Effects of carbohydrate supplementation on performance and carbohydrate oxidation after intensified cycling training. *Journal of applied physiology*, 97(4), 1245-1253.

Hamer, H. M., Jonkers, D. M. A. E., Venema, K., et al. (2008). Review article: the role of butyrate on colonic function. *Alimentary pharmacology and therapeutics*, 27(2), 104-119.

Handzlik, M. K., Shaw, A. J., Dungey, M., et al. (2013). The influence of exercise training status on antigen-stimulated IL-10 production in whole blood culture and numbers of circulating regulatory T cells. *European journal of applied physiology*, 113(7), 1839-1848.

Hao, Q., Dong, B.R., and Wu, T. (2015). Probiotics for preventing acute upper respiratory tract infections. *Cochrane Database Systemic Reviews* 2: 2015: CD006895

Hart, A. L., Lammers, K., Brigidi, P., et al. (2004). Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria. *Gut*, 53(11), 1602-1609.

Hassmen P., and Blomstrand, E. (1991) Mood change and marathon running: a pilot study using a Swedish version of the POMS test. *Scandinavian Journal of Psychology* 32, 225-232

Haywood, B. A., Black, K. E., Baker, D., et al. (2014). Probiotic supplementation reduces the duration and incidence of infections but not severity in elite rugby union players. *Journal of Science and Medicine in Sport*, 17(4), 356-360.

He, B., Xu, W., Santini, P. A., et al. (2007). Intestinal bacteria trigger T cell-independent immunoglobulin A 2 class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine APRIL. *Immunity*, 26(6), 812-826.

He, C. S., Handzlik, M. K., Fraser, W. D., et al. (2013). Influence of vitamin D status on respiratory infection incidence and immune function during 4 months of winter training in endurance sport athletes.

He, C. S., Fraser, W. D., Tang, J., et al. (2016). The effect of 14 weeks of vitamin D3 supplementation on antimicrobial peptides and proteins in athletes. *Journal of sports sciences*, 34(1), 67-74.

Heinemeier, K., Langberg, H., and Kjaer, M. (2003). Exercise-induced changes in circulating levels of transforming growth factor- β -1 in humans: methodological considerations. *European journal of applied physiology*, 90(1-2), 171-177.

Heinonen, I., Kalliokoski, K. K., Hannukainen, J. C., et al. (2014). Organ-specific physiological responses to acute physical exercise and long-term training in humans. *Physiology*, 29(6), 421-436.

Heitkamp, H. C., Wegler, S., Brehme, U., et al (2008). Effect of an 8-week endurance training program on markers of antioxidant capacity in women. *Journal of sports medicine and physical Fitness*, 48(1), 113.

Hellard, P., Avalos, M., Guimaraes, F., et al. (2015). Training-related risk of common illnesses in elite swimmers over a 4-yr period. *Medicine and science in sports and exercise*, 47(4), 698-707.

Hildebrandt, M. A., Hoffmann, C., Sherrill-Mix, S. A., et al. (2009). High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity. *Gastroenterology*, 137(5), 1716-1724.

Hill, C., Guarner, F., Reid, G., et al. (2014). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 11, 506-514.

Hojsak, I., Snovak, N., Abdović, S., et al. (2010). Lactobacillus GG in the prevention of gastrointestinal and respiratory tract infections in children who attend day care centers: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clinical Nutrition*, 29(3), 312-316.

Holzappel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., et al. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American journal of clinical nutrition*, 73(2), 365s-373s.

Hong, S., and Mills, P. J. (2008). Effects of an exercise challenge on mobilization and surface marker expression of monocyte subsets in individuals with normal vs. elevated blood pressure. *Brain, behavior, and immunity*, 22(4), 590-599.

Hooper, L. V. (2009). Do symbiotic bacteria subvert host immunity?. *Nature Reviews Microbiology*, 7(5), 367-374.

Hsu, Y. J., Chiu, C. C., Li, Y. P., et al. (2015). Effect of intestinal microbiota on exercise performance in mice. *The Journal of Strength and Conditioning Research*, 29(2), 552-558.

Human Microbiome Project Consortium. (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486(7402), 207-214.

Humbert, R., Adler, D.A., Disteche, C.M., et al. (1993). The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nature genetics*, 3(1), 73-76.

Iacono, A..Probiotics as an emerging therapeutic strategy to treat NAFLD: focus on molecular and biochemical mechanisms. *Journal of nutritional biochemistry*, 2011. 22(8): p. 699-711.

Ibnou-Zekri, N., Blum, S., Schiffrin, E. J., et al. (2003). Divergent patterns of colonization and immune response elicited from two intestinal Lactobacillus strains that display similar properties in vitro. *Infection and immunity*, 71(1), 428-436.

Ihalainen, J. K., Schumann, M., Häkkinen, K., et al. (2015). Mucosal immunity and upper respiratory tract symptoms in recreational endurance runners. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 41(1), 96-102.

Isolauri, E., Joensuu, J., Suomalainen, H., et al. (1995). Improved immunogenicity of oral D x RRV reassortant rotavirus vaccine by Lactobacillus casei GG. *Vaccine*, 13(3), 310-312.

Israel, S., Buhl, B., and Neumann, G. (1982). Die konzentration der immunglobuline A, G und M im serum bei trainierten und untrainierten sowie nach verschiedenen sportlichen ausdauerleistungen. *Med Sport (Berlin)*, 22, 225-31.

Ivanov, I. I., and Honda, K. (2012). Intestinal commensal microbes as immune modulators. *Cell host and microbe*, 12(4), 496-508.

Ivanovic, N., Minic, R., Dimitrijevic, L., et al. (2015). Lactobacillus rhamnosus LA68 and Lactobacillus plantarum WCFS1 differently influence metabolic and immunological parameters in high fat diet-induced hypercholesterolemia and hepatic steatosis. *Food and function*, 6(2), 558-565.

Jäger, R., Shields, K. A., Lowery, R. P., et al. (2016). Probiotic Bacillus coagulans GBI-30, 6086 reduces exercise-induced muscle damage and increases recovery. *PeerJ*, 4, e2276.

James, R. W., and Deakin, S. P. (2004). The importance of high-density lipoproteins for paraoxonase-1 secretion, stability, and activity. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(12), 1986-1994.

Ji, L. L. (2008). Modulation of skeletal muscle antioxidant defense by exercise: role of redox signaling. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(2), 142-152.

Jones, A. W., Cameron, S. J., Thatcher, R., et al. (2014). Effects of bovine colostrum supplementation on upper respiratory illness in active males. *Brain, behavior, and immunity*, 39, 194-203.

Kaila, M., Isolauri, E., Soppi, E., et al. (1992). Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human Lactobacillus strain. *Pediatric research*, 32(2), 141-144.

Kamada, N., Chen, G. Y., Inohara, N., et al. (2013). Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nature immunology*, 14(7), 685-690.

Kamen, D. L., and Tangpricha, V. (2010). Vitamin D and molecular actions on the immune system: modulation of innate and autoimmunity. *Journal of molecular medicine*, 88(5), 441-450.

Kandori, H., Hirayama, K., Takeda, M., et al. (1996). Histochemical, lectin-histochemical and morphometrical characteristics of intestinal goblet cells of germfree and conventional mice. *Experimental animals*, 45(2), 155-160.

Kapila, S., Sinha, P.R. and Singh, S. (2007). Influence of feeding fermented milk and non-fermented milk containing *Lactobacillus casei* on immune response in mice. *Food and agricultural immunology*, 18, 75–82.

Kapila, R., Kapila, S., Kapasiya, M., et al. (2012). Comparative evaluation of oral administration of probiotic *Lactobacilli*-fermented milks on macrophage function. *Probiotics Antimicrobial Proteins* 4, 173–179.

Kekkonen, R. A., Vasankari, T. J., Vuorimaa, T., et al. (2007). The effect of probiotics on respiratory infections and gastrointestinal symptoms during training in marathon runners. *International journal of sport nutrition and exercise metabolism*, 17(4), 352.

Kemgang, T. S., Kapila, S., Shanmugam, V. P., et al. (2014). Cross-talk between probiotic *lactobacilli* and host immune system. *Journal of applied microbiology*, 117(2), 303-319.

Khan, J., Iiboshi, Y., Cui, L., et al. (1999). Role of intestinal mucus on the uptake of latex beads by Peyer's patches and on their transport to mesenteric lymph nodes in rats. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 23(1), 19-23.

Kim, H. S., Park, H., Cho, I. Y., et al. (2006). Dietary supplementation of probiotic *Bacillus polyfermenticus*, Bispan strain, modulates natural killer cell and T cell subset populations and immunoglobulin G levels in human subjects. *Journal of medicinal food*, 9(3), 321-327.

Kim, J. Y., Choi, Y. O., and Ji, G. E. (2008). Effect of oral probiotics (*Bifidobacterium lactis* AD011 and *Lactobacillus acidophilus* AD031) administration on ovalbumin-induced food allergy mouse model. *Journal of microbiology and biotechnology*, 18(8), 1393-1400.

Kizaki, T., Takemasa, T., Sakurai, T., et al. (2008). Adaptation of macrophages to exercise training improves innate immunity. *Biochemical and biophysical research communications*, 372(1), 152-156.

- Kim, H. J., Kim, Y. J., Lee, S. H., et al. (2014). Effects of *Lactobacillus rhamnosus* on allergic march model by suppressing Th2, Th17, and TSLP responses via CD4+ CD25+ Foxp3+ Tregs. *Clinical Immunology*, 153(1), 178-186.
- Kjaer, M., Secher, N. H., Bangsbo, J., et al. (1996). Hormonal and metabolic responses to electrically induced cycling during epidural anesthesia in humans. *Journal of Applied Physiology*, 80(6), 2156-2162.
- Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., et al. (1998). Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International journal of food microbiology*, 41(2), 103-125.
- Knez, W. L., Jenkins, D. G., and Coombes, J. S. (2007). Oxidative stress in half and full Ironman triathletes. *Medicine and science in sports and exercise*, 39(2), 283.
- Koch, A. J., Wherry, A. D., Petersen, M. C., et al. (2007). Salivary immunoglobulin A response to a collegiate rugby game. *The Journal of Strength and Conditioning Research*, 21(1), 86-90.
- Kohut, M. L., Davis, J. M., Jackson, D. A., et al. (1998). The role of stress hormones in exercise-induced suppression of alveolar macrophage antiviral function. *Journal of neuroimmunology*, 81(1), 193-200.
- Konieczna, P., Groeger, D., Ziegler, M., et al. (2011). *Bifidobacterium infantis* 35624 administration induces Foxp3 T regulatory cells in human peripheral blood: potential role for myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Gut*, gutjnl-2011.
- König, D., Grathwohl, D., Weinstock, C., et al. (1999). Upper respiratory tract infection in athletes: influence of lifestyle, type of sport, training effort, and immunostimulant intake. *Exercise immunology review*, 6, 102-120.
- Kotur-Stevuljević, Polimorfizam paraoksonaze 1 kod pacijenata sa angiografski dokazanom koronarnom bolešću. Doktorska disertacija, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu, 2007.
- Kotur-Stevuljevic, J., Bogavac-Stanojevic, N., Jelic-Ivanovic, Z., et al. (2015). Oxidative stress and paraoxonase 1 status in acute ischemic stroke patients. *Atherosclerosis*, 241, 192-8.

- Kotur-Stevuljević, J., Spasić, S., Jelić-Ivanović, Z., et al. (2008). PON1 status is influenced by oxidative stress and inflammation in coronary heart disease patients. *Clinical biochemistry*, 41, 1067-1073.
- Krüger, K., and Mooren, F. C. (2007). T cell homing and exercise. *Exerc Immunol Rev*, 13, 37-54.
- Kubo, Y., Rooney, A. P., Tsukakoshi, Y., et al. (2011). Phylogenetic analysis of *Bacillus subtilis* strains applicable to natto (fermented soybean) production. *Applied and environmental microbiology*, 77(18), 6463-6469.
- Kukkonen, K., Nieminen, T., Poussa, T., et al. (2006). Effect of probiotics on vaccine antibody responses in infancy—a randomized placebo-controlled double-blind trial. *Pediatric allergy and immunology*, 17(6), 416-421.
- Kumpu, M., Kekkonen, R. A., Kautiainen, H., et al. (2012). Milk containing probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG and respiratory illness in children: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *European journal of clinical nutrition*, 66(9), 1020-1023.
- Kutteh, W. H., Prince, S. J., and Mestecky, J. (1982). Tissue origins of human polymeric and monomeric IgA. *The Journal of Immunology*, 128(2), 990-995.
- Kwon, H. K., Lee, C. G., So, J. S., et al. (2010). Generation of regulatory dendritic cells and CD4⁺ Foxp3⁺ T cells by probiotics administration suppresses immune disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(5), 2159-2164.
- Lambert, J. E., Myslicki, J. P., Bomhof, M. R., et al. (2015). Exercise training modifies gut microbiota in normal and diabetic mice. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 40(7), 749-752.
- Lamm, M. E. (1998). IV. How epithelial transport of IgA antibodies relates to host defense. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 274(4), G614-G617.

Lamprecht, M., Hofmann, P., Greilberger, J. F., et al. (2009). Increased lipid peroxidation in trained men after 2 weeks of antioxidant supplementation. *International journal of sport nutrition*, 19(4), 385.

Lamprecht, M., Bogner, S., Schippinger, G., et al. (2012). Probiotic supplementation affects markers of intestinal barrier, oxidation, and inflammation in trained men; a randomized, double-blinded, placebo-controlled trial. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 9, 45

Lancaster, G. I., Khan, Q., Drysdale, P., et al. (2005). The physiological regulation of toll-like receptor expression and function in humans. *The Journal of physiology*, 563(3), 945-955.

Langkamp-Henken, B., Rowe, C. C., Ford, A. L., et al. (2015). Bifidobacterium bifidum R0071 results in a greater proportion of healthy days and a lower percentage of academically stressed students reporting a day of cold/flu: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *British Journal of Nutrition*, 113(03), 426-434.

Lavasani, S., Dzhambazov, B., Nouri, M., et al. (2010). A novel probiotic mixture exerts a therapeutic effect on experimental autoimmune encephalomyelitis mediated by IL-10 producing regulatory T cells. *PloS one*, 5(2), e9009.

LeBlanc, J. G., Milani, C., de Giori, G. S., et al. (2013). Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective. *Current opinion in biotechnology*, 24(2), 160-168.

Leroy, F., Falony, G., and de Vuyst, L. (2008). Latest developments in probiotics. In *Meat biotechnology* (pp. 217-229). Springer New York.

Ley, R. E., Lozupone, C. A., Hamady, M., Knight, R., and Gordon, J. I. (2008). Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, 6(10), 776-788.

Leyer, G. J., Li, S, Mubasher, M.E., et al. (2009) Probiotic effects on cold and influenza-like symptom incidence and duration in children. *Pediatrics*, 124, E172–E179.

Liao, H. F., Chiang, L. M., Yen, C.C., et al. Effect of a periodized exercise training and active recovery program on antitumor activity and development of dendritic cells. *J Sports Med Phys Fitness* 46: 307-314, 2006.

- Libby, P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation*, 2001; 104: 365–372
- Liu, M. L., Bergholm, R., Mäkimattila, S., et al. (1999). A marathon run increases the susceptibility of LDL to oxidation in vitro and modifies plasma antioxidants. *Am. J. Physiol.* 276:E1083-E1091.
- Liu, Y., and Rhoads, J. M. (2013). Communication between B-cells and microbiota for the maintenance of intestinal homeostasis. *Antibodies*, 2(4), 535-553.
- Liao, H. F., Chiang, L. M., Yen, C. C., et al. (2006). Effect of a periodized exercise training and active recovery program on antitumor activity and development of dendritic cells. *Journal of sports medicine and physical fitness*, 46(2), 307.
- Lührs, H., Gerke, T., Müller, J. G., et al. (2002). Butyrate inhibits NF-κB activation in lamina propria macrophages of patients with ulcerative colitis. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 37(4), 458-466.
- Lye, H. S., Rusul, G., and Liong, M. T. (2010). Removal of cholesterol by lactobacilli via incorporation and conversion to coprostanol. *Journal of dairy science*, 93(4), 1383-1392.
- Maassen, C. B., Boersma, W. J., van Holten-Neelen, C., et al. (2003). Growth phase of orally administered *Lactobacillus* strains differentially affects IgG1/IgG2a ratio for soluble antigens: implications for vaccine development. *Vaccine*, 21(21), 2751-2757.
- MacDonald, T. T., and Monteleone, G. (2005). Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science*, 307(5717), 1920-1925.
- Mach, N., and Fuster-Botella, D. (2016). Endurance exercise and gut microbiota: A review. *Journal of Sport and Health Science*.
- Mackinnon, L. T., Ginn, E., and Seymour, G. J. (1993). Decreased salivary immunoglobulin A secretion rate after intense interval exercise in elite kayakers. *European journal of applied physiology and occupational physiology*, 67(2), 180-184.

- MacKinnon, L. T., and Jenkins, D. G. (1993). Decreased salivary immunoglobulins after intense interval exercise before and after training. *Medicine and science in sports and exercise*, 25(6), 678-683.
- MacNeil, B. and Hoffman-Goetz, L. (1993). Effect of exercise on natural cytotoxicity and pulmonary tumor metastases in mice. *Medicine and science in sports and exercise*, 25(8), 922-928.
- Macpherson, A. J., and Uhr, T. (2004). Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science*, 303(5664), 1662-1665.
- Majamaa, H., Isolauri, E., Saxelin, M., et al. (1995). Lactic acid bacteria in the treatment of acute rotavirus gastroenteritis. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 20(3), 333-338.
- Maldonado, G.C. and Perdigon, G. (2006) The probiotic bacterium *Lactobacillus casei* induces activation of the gut mucosal immune system through innate immunity. *Clinical vaccine immunology* 13, 219–226.
- Malm, C., Svensson, M., Ekblom, B., et al. (1997). Effects of ubiquinone-10 supplementation and high intensity training on physical performance in humans. *Acta Physiologica Scandinavica*, 161(3), 379-384.
- Martarelli, D., Verdenelli, M. C., Scuri, S., et al. (2011). Effect of a probiotic intake on oxidant and antioxidant parameters in plasma of athletes during intense exercise training. *Current microbiology*, 62(6), 1689-1696.
- Marteau, P. (2001). Safety aspect of probiotic products. *Scandinavian Journal of Nutrition*, 45, 22–24.
- Martinovic, J., Dopsaj, V., Dopsaj, M. J., et al. (2009). Long-term effects of oxidative stress in volleyball players. *International journal of sports medicine*, 30(12), 851-856.
- Martinovic, J., Dopsaj, V., Kotur-Stevuljevic, J., et al. (2011). Oxidative stress biomarker monitoring in elite women volleyball athletes during a 6-week training period. *The Journal of Strength and Conditioning Research*, 25(5), 1360-1367.

- Maathuis, A., Keller, D., and Farmer, S. (2009). Survival and metabolic activity of the GanedenBC30 strain of *Bacillus coagulans* in a dynamic in vitro model of the stomach and small intestine. *Beneficial microbes*, 1(1), 31-36.
- Margaritis, I., Palazzetti, S., Rousseau, A. S., et al. (2003). Antioxidant supplementation and tapering exercise improve exercise-induced antioxidant response. *Journal of the American College of Nutrition*, 22(2), 147-156.
- Mattson, M. P. (2008). Hormesis defined. *Ageing research reviews*, 7(1), 1-7.
- Mayer, E. A. (2011). Gut feelings: the emerging biology of gut–brain communication. *Nature Reviews Neuroscience*, 12(8), 453-466.
- Maynard C. L., and Weaver C. T. (2008). Diversity in the contribution of interleukin-10 to T-cell-mediated immune regulation. *Immunology Review*, 226, 219-33.
- McCarthy, D. A., Macdonald, I., Grant, M., et al. (1992). Studies on the immediate and delayed leucocytosis elicited by brief (30-min) strenuous exercise. *European journal of applied physiology and occupational physiology*, 64(6), 513-517.
- McCracken, V. J., Chun, T., Baldeón, M. E., et al. (2002). TNF- α sensitizes HT-29 colonic epithelial cells to intestinal lactobacilli. *Experimental biology and medicine*, 227(8), 665-670.
- McFarlin, B. K., Carpenter, K. C., Davidson, T., et al. (2013). Baker's yeast beta glucan supplementation increases salivary IgA and decreases cold/flu symptomatic days after intense exercise. *Journal of dietary supplements*, 10(3), 171-183.
- McFarlin, B. K., Flynn, M. G., Campbell, W. W., et al. (2006). Physical activity status, but not age, influences inflammatory biomarkers and toll-like receptor 4. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 61(4), 388-393.
- McMahan, C. A., Gidding, S. S., Fayad, Z. A., et al. (2005). Risk scores predict atherosclerotic lesions in young people. *Archives of Internal Medicine*, 165(8), 883-890.
- McNair, D. M., Lorr, M., and Droppleman, L. F. (1971). Manual for the profile of mood states. *San Diego, CA: Educational and Industrial Testing Service*.

- Miettinen, M., Vuopio-Varkila, J., and Varkila, K. (1996). Production of human tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and interleukin-10 is induced by lactic acid bacteria. *Infection and immunity*, 64(12), 5403-5405.
- Miller, G. J., and Miller, N. E. (1975). Plasma-high-density-lipoprotein concentration and development of ischaemic heart-disease. *The lancet*,305(7897), 16-19.
- Minevich, J., Olson, M. A., Mannion, J. P., et al. (2015). Digestive enzymes reduce quality differences between plant and animal proteins: a double-blind crossover study.*Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 12(Suppl 1), P26.
- Mishra, V., Shah, C., Mokashe, N., et al. (2015). Probiotics as potential antioxidants: a systematic review. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(14), 3615-3626.
- Misra, H. P., and Fridovich, I. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase.*Journal of Biological chemistry*, 247(10), 3170-3175.
- Monteiro, R. C., and Van De Winkel, J. G. (2003). IgA Fc receptors. *Annual review of immunology*, 21(1), 177-204.
- Mooren, F. C., Blöming, D., Lechtermann, A., et al. (2002). Lymphocyte apoptosis after exhaustive and moderate exercise. *Journal of applied physiology*, 93(1), 147-153.
- Moreira, A., Arsati, F., Cury, P. R., et al. (2009). Salivary immunoglobulin a response to a match in top-level brazilian soccer players. *The Journal of Strength and Conditioning Research*, 23(7), 1968-1973.
- Moreira, A., Kekkonen, R., Korpela, R., et al. (2007). Allergy in marathon runners and effect of Lactobacillus GG supplementation on allergic inflammatory markers. *Respiratory medicine*, 101(6), 1123-1131.
- Morton, R. W., McGlory, C., and Phillips, S. M. (2015). Nutritional interventions to augment resistance training-induced skeletal muscle hypertrophy. *Frontiers in physiology*, 6.

Moss MA, Wong CSY, Tan MH, et al. (1986). Determination of low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) in serum by BioMerieux cholesterol/phospholipids polyanions precipitation method and comparison with preparative ultracentrifugation. *Clinical chemistry*, 32, 1096-7.

Mowat, A. M. (2003). Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nature Reviews Immunology*, 3(4), 331-341.

Muhamad, A., and Gleeson, M. (2014). Effects of a 14-strain Probiotics Supplement on Salivary Antimicrobial Proteins at Rest and in Response to an Acute Bout of Prolonged Exercise. *International Journal of Sports Science*,4(2), 60-66.

Nandakumar, S., Miller, C. W., and Kumaraguru, U. (2009). T regulatory cells: an overview and intervention techniques to modulate allergy outcome. *Clinical and Molecular Allergy*, 7(1), 1.

Nehlsen-Cannarella, S. L., Nieman, D. C., Balk-Lamberton, A. J., et al. (1991). The effects of moderate exercise training on immune response. *Medicine and science in sports and exercise*, 23(1), 64-70.

Niborski V., Ernouf, C, and Maury, S. (2008). Effect of the consumption of a fermented milk on common infections in adults submitted to multi-stressor situation. Villeneuve Saint-Georges: Danone Research.

Nieman, D. C., Henson, D. A., Dumke, C. L., et al. (2006). Relationship between salivary IgA secretion and upper respiratory tract infection following a 160-km race. *Journal of sports medicine and physical fitness*, 46(1), 158.

Nieman, D. C., Henson, D. A., Austin, M. D., et al. (2011). Upper respiratory tract infection is reduced in physically fit and active adults. *British journal of sports medicine*, 45(12), 987-992.

Nieman, D. C., Henson, D. A., Fagoaga, O. R., et al. (2002). Change in salivary IgA following a competitive marathon race. *International journal of sports medicine*,23(01), 69-75.

Nieman, D. C., Henson, D. A., Gross, S. J., et al. (2007). Quercetin reduces illness but not immune perturbations after intensive exercise. *Medicine and science in sports and exercise*, 39(9), 1561.

Nieman, D. C., Henson, D. A., Mcanulty, S. R., et al. (2004). Vitamin E and immunity after the Kona triathlon world championship. *Medicine and science in sports and exercise*, *36*, 1328-1335.

Nieman, D. C., Henson, D. A., McMahon, M., et al. (2008). B-glucan, immune function, and upper respiratory tract infections in athletes. *Med Sci Sports Exerc*, *40*, 1463-1471.

Nieman, D. C., Nehlsen-Cannarella, S. L., Markoff, P. A., et al. (1990). The effects of moderate exercise training on natural killer cells and acute upper respiratory tract infections. *International journal of sports medicine*, *11*(06), 467-473.

Nieman, D. C., and Nehlsen-Cannarella, S. L. (1991). The effects of acute and chronic exercise on immunoglobulins. *Sports Medicine*, *11*(3), 183-201.

Niers, L. E., Hoekstra, M. O., Timmerman, H. M., et al. (2007). Selection of probiotic bacteria for prevention of allergic diseases: immunomodulation of neonatal dendritic cells. *Clinical and Experimental Immunology*, *149*(2), 344-352.

Niers, L. E., Timmerman, H. M., Rijkers, G. T., et al. (2005). Identification of strong interleukin-10 inducing lactic acid bacteria which down-regulate T helper type 2 cytokines. *Clinical and Experimental Allergy*, *35*(11), 1481-1489.

O'Brien, K. V., Stewart, L. K., Forney, L. A., et al. (2015). The effects of postexercise consumption of a kefir beverage on performance and recovery during intensive endurance training. *Journal of dairy science*, *98*(11), 7446-7449.

Okutsu, M., Suzuki, K., Ishijima, T., et al. (2008). The effects of acute exercise-induced cortisol on CCR2 expression on human monocytes. *Brain, behavior, and immunity*, *22*(7), 1066-1071.

Olivares, M., Díaz-Ropero, M. P., Gómez, N., et al. (2006). Dietary deprivation of fermented foods causes a fall in innate immune response. Lactic acid bacteria can counteract the immunological effect of this deprivation. *Journal of dairy research*, *73*(04), 492-498.

O'Mahony, L., McCarthy, J., Kelly, P., et al. (2005). Lactobacillus and bifidobacterium in irritable bowel syndrome: symptom responses and relationship to cytokine profiles. *Gastroenterology*, *128*(3), 541-551.

- Ortega, E., Rodriguez, M. J., Barriga, C., et al. (1996). Corticosterone, prolactin and thyroid hormones as hormonal mediators of the stimulated phagocytic capacity of peritoneal macrophages after high-intensity exercise. *International journal of sports medicine*, 17(02), 149-155.
- Otocka-Kmiecik, A. and Orłowska-Majdak, M. (2009). The role of genetic (PON1 polymorphism) and environmental factors, especially physical activity, in antioxidant function of paraoxonase. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 63,668–677.
- Otsuki, T., Shimizu, K., Iemitsu, M., et al. (2011). Salivary secretory immunoglobulin A secretion increases after 4-weeks ingestion of chlorella-derived multicomponent supplement in humans: a randomized cross over study. *Nutrition journal*, 10(1), 1.
- Otte, J. M., and Podolsky, D. K. (2004). Functional modulation of enterocytes by gram-positive and gram-negative microorganisms. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 286(4), G613-G626.
- Ouwehand, A. C., Ten Bruggencate, S. J. M., Schonewille, A. J., et al. (2014). Lactobacillus acidophilus supplementation in human subjects and their resistance to enterotoxigenic Escherichia coli infection. *British Journal of Nutrition*, 111(03), 465-473.
- Owens, D. J., Fraser, W. D., and Close, G. L. (2015). Vitamin D and the athlete: emerging insights. *European journal of sport science*, 15(1), 73-84.
- Paineau, D., Carcano, D., Leyer, G., et al. (2008). Effects of seven potential probiotic strains on specific immune responses in healthy adults: a double-blind, randomized, controlled trial. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 53(1), 107-113.
- Patarca, R. (2001). Cytokines and chronic fatigue syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 933(1), 185-200.
- Paturi, G., Phillips, M., Jones, M., et al. (2007). Immune enhancing effects of Lactobacillus acidophilus LAFTI L10 and Lactobacillus paracasei LAFTI L26 in mice. *International journal of food microbiology*, 115(1), 115-118.

- Paturi, G., Phillips, M., and Kailasapathy, K. (2008). Effect of probiotic strains *Lactobacillus acidophilus* LAFTI L10 and *Lactobacillus paracasei* LAFTI L26 on systemic immune functions and bacterial translocation in mice. *Journal of Food Protection*, 71(4), 796-801.
- Peake, J. M. (2002). Exercise-induced alterations in neutrophil degranulation and respiratory burst activity: possible mechanisms of action. *Exercise immunology review*, 8, 49-100.
- Pereira, D. I., McCartney, A. L., and Gibson, G. R. (2003). An in vitro study of the probiotic potential of a bile-salt-hydrolyzing *Lactobacillus fermentum* strain, and determination of its cholesterol-lowering properties. *Applied and environmental microbiology*, 69(8), 4743-4752.
- Peternelj, T.T. and Coombes, J.S. (2011). Antioxidant supplementation during exercise training. *Sports medicine*, 41(12), 1043-1069.
- Petriz, B. A., Castro, A. P., Almeida, J. A., et al. (2014). Exercise induction of gut microbiota modifications in obese, non-obese and hypertensive rats. *BMC genomics*, 15(1), 1.
- Plaza-Diaz, J., Gomez-Llorente, C., Campaña-Martin, L., et al. (2013). Safety and immunomodulatory effects of three probiotic strains isolated from the feces of breast-fed infants in healthy adults: SETOPROB study. *PloS one*, 8(10), e78111.
- Potteiger, J. A., Chan, M. A., Haff, G. G., et al. (2001). Training status influences T-cell responses in women following acute resistance exercise. *The Journal of Strength and Conditioning Research*, 15(2), 185-191.
- Prakash, S., Rodes, L., Coussa-Charley, M., et al. (2011). Gut microbiota: next frontier in understanding human health and development of biotherapeutics. *Biologics*, 5, 71-86.
- Proctor, G. B., Garrett, J. R., Carpenter, G. H., et al. (2003). Salivary secretion of immunoglobulin A by submandibular glands in response to autonomic infusions in anaesthetised rats. *Journal of neuroimmunology*, 136(1), 17-24.
- Queipo-Ortuño, M. I., Seoane, L. M., Murri, M., et al. (2013). Gut microbiota composition in male rat models under different nutritional status and physical activity and its association with serum leptin and ghrelin levels. *PloS one*, 8(5), e65465.

Rajković, M. G., Rumora, L., Juretić, D., et al. (2010). Effect of non-genetic factors on paraoxonase 1 activity in patients undergoing hemodialysis. *Clinical biochemistry*, 43(18), 1375-1380.

Rajpal, S. and Kansal, V.K. (2009). Probiotic Dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* stimulates immune system in mice. *Milchwissenschaft* 64, 147–150.

Rehm, K., Sunesara, I., and Marshall, G. D. (2015). Increased circulating anti-inflammatory cells in marathon-trained runners. *International journal of sports medicine*, 94(10), 832-836.

Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., et al. (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature immunology*, 2(4), 361-367.

Reynolds, H. Y. (1988). Immunoglobulin G and its function in the human respiratory tract. *Mayo Clinic Proceedings* 63(2), 161-174.

Richter, R. and Furlong, C.E. (1999). Determination of paraoxonase 1 (PON1) status requires more than genotyping. *Pharmacogenetics*, 9, 745–753.

Rinne, M., Kalliomaki, M., Arvilommi, H., Salminen, S., and Isolauri, E. (2005). Effect of probiotics and breastfeeding on the bifidobacterium and lactobacillus/enterococcus microbiota and humoral immune responses. *The Journal of pediatrics*, 147(2), 186-191.

Ristow, M., and Zarse, K. (2010). How increased oxidative stress promotes longevity and metabolic health: The concept of mitochondrial hormesis (mitohormesis). *Experimental gerontology*, 45(6), 410-418.

Rizzello, V., Bonaccorsi, I., Dongarra, M. L., et al. (2011). Role of natural killer and dendritic cell crosstalk in immunomodulation by commensal bacteria probiotics. *BioMed Research International*, 2011.

Robson, P., Blannin, A. K., Walsh, N. P., et al. (1999). Effects of exercise intensity, duration and recovery on in vitro neutrophil function in male athletes. *International journal of sports medicine*, 20(02), 128-130.

- Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., et al. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of biotechnology*, 84(3), 197-215.
- Salzman, N. H., and Bevins, C. L. (2013, November). Dysbiosis—a consequence of Paneth cell dysfunction. In *Seminars in immunology* (Vol. 25, No. 5, pp. 334-341). Academic Press.
- Sánchez-Quesada, J. L., Jorba, O., Payés, A., et al. (1998). Ascorbic acid inhibits the increase in low-density lipoprotein (LDL) susceptibility to oxidation and the proportion of electronegative LDL induced by intense aerobic exercise. *Coronary artery disease*, 9(5), 249-256.
- Sashihara, T., Nagata, M., Mori, T., et al. (2013). Effects of *Lactobacillus gasseri* OLL2809 and α -lactalbumin on university-student athletes: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 38(12), 1228-1235.
- Schlee, M., Harder, J., Kotten, B., et al. (2008). Probiotic lactobacilli and VSL#3 induce enterocyte beta defensin 2. *Clinical experimental immunology*, 151, 528–535.
- Scoccia, A. E., Molinuevo, M. S., McCarthy, A. D., et al. (2001). A simple method to assess the oxidative susceptibility of low density lipoproteins. *BMC clinical pathology*, 1(1), 1.
- Sekirov, I., Russell, S. L., Antunes, L. C. M., et al. (2010). Gut microbiota in health and disease. *Physiological reviews*, 90(3), 859-904.
- Selmeci, L., Seres, L., Antal, M., et al. (2005). Advanced oxidation protein products (AOPP) for monitoring oxidative stress in critically ill patients: a simple, fast and inexpensive automated technique. *Clinical Chemical Laboratory Medicine*, 43(3), 294-297.
- Senti, M., Tomás, M., Anglada, R., et al. (2003). Interrelationship of smoking, paraoxonase activity, and leisure time physical activity: a population-based study. *European journal of internal medicine*, 14(3), 178-184.
- Jain, S., Yadav, H., Sinha, P. R., et al. (2010). Anti-allergic effects of probiotic Dahi through modulation of the gut immune system. *Turkish journal of gastroenterology*, 21(3), 244-250.

Shao, F., and Xu, X. D. (2013). Effect of microbiological and immunological enteral nutrition on intestinal function and immune status in the patients with long-term use of antibiotics. *European review for medical and pharmacological sciences*, 17(18), 2481-2485.

Sheih, Y. H., Chiang, B. L., Wang, L. H., et al. (2001). Systemic immunity-enhancing effects in healthy subjects following dietary consumption of the lactic acid bacterium *Lactobacillus rhamnosus* HN001. *Journal of the American College of Nutrition*, 20(2), 149-156.

Shek, P. N., Sabiston, B. H., Buguet, A., et al. (1995). Strenuous exercise and immunological changes. *International journal of sports medicine*, 16(07), 466-474.

Shek, P. N., and Shephard, R. J. (1998). Physical exercise as a human model of limited inflammatory response. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 76(5), 589-597.

Shephard, R. J., Kavanagh, T., Mertens, D. J. et al (1995). Personal health benefits of Masters athletics competition. *British Journal of Sports Medicine*, 29(1), 35-40.

Shephard, R. J. (2003). Adhesion molecules, catecholamines and leucocyte redistribution during and following exercise. *Sports medicine*, 33(4), 261-284.

Shing, C. M., Peake, J. M., Lim, C. L., et al. (2014). Effects of probiotics supplementation on gastrointestinal permeability, inflammation and exercise performance in the heat. *European journal of applied physiology*, 114(1), 93-103.

Simpson, R. J., McFarlin, B. K., McSparran, C., et al. (2009). Toll-like receptor expression on classic and pro-inflammatory blood monocytes after acute exercise in humans. *Brain, behavior, and immunity*, 23(2), 232-239.

Sindhu, K. N., Sowmyanarayanan, T. V., Paul, A., et al. (2014). Immune response and intestinal permeability in children with acute gastroenteritis treated with *Lactobacillus rhamnosus* GG: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clinical infectious diseases*, 58(8), 1107-1115.

Smerud, H. K., Kleiveland, C. R., Mosland, A. R., et al. (2008). Effect of a probiotic milk product on gastrointestinal and respiratory infections in children attending day-care. *Microbial ecology in health and disease*, 20(2), 80-85.

- Socol, C. R., Vandenberghe, L. P. D. S., Spier, M. R., et al. (2010). The potential of probiotics: a review. *Food Technology and Biotechnology*, 48(4), 413-434.
- Sommer, F., and Bäckhed, F. (2013). The gut microbiota—masters of host development and physiology. *Nature Reviews Microbiology*, 11(4), 227-238.
- Steenbergen, L., Sellaro, R., van Hemert, S., et al. (2015). A randomized controlled trial to test the effect of multispecies probiotics on cognitive reactivity to sad mood. *Brain, behavior, and immunity*, 48, 258-264.
- Steenberg, A., Toft, A. D., Bruunsgaard, H., et al. (2001). Strenuous exercise decreases the percentage of type 1 T cells in the circulation. *Journal of applied physiology*, 91(4), 1708-1712.
- Stojanović, M., Inić-Kanada, A., Popović, Z., et al. (2004). Changes in pools of autoantibodies and anti-bacterial antibodies in patients suffering from recurrent infections of the urinary tract and undergoing bacterial immunization treatment. *Immunology letters*, 94(1), 123-133.
- Svendsen, I. S., Killer, S. C., and Gleeson, M. (2014). Influence of hydration status on changes in plasma cortisol, leukocytes, and antigen-stimulated cytokine production by whole blood culture following prolonged exercise. *ISRN nutrition*, 2014.
- Takeda, K., Suzuki, T., Shimada, S. I., et al. (2006). Interleukin-12 is involved in the enhancement of human natural killer cell activity by *Lactobacillus casei* Shirota. *Clinical and Experimental Immunology*, 146(1), 109-115.
- Talbott, S., and Talbott, J. (2009). Effect of BETA 1, 3/1, 6 GLUCAN on upper respiratory tract infection symptoms and mood state in marathon athletes. *Journal of sports science and medicine* 8(4), 509-515.
- Teixeira, V. H., Valente, H. F., Casal, S. I., et al. (2009). Antioxidants do not prevent postexercise peroxidation and may delay muscle recovery. *Medicine and science in sports and exercise*, 41(9), 1752-60.
- Tezuka, H., Abe, Y., Iwata, M., et al. (2007). Regulation of IgA production by naturally occurring TNF/iNOS-producing dendritic cells. *Nature*, 448(7156), 929-933.

Thomas, M.C. and Versalovic, J. (2010) Probiotics-host communication: modulation of signaling pathways in the intestine. *Gut Microbes* 1, 148–163.

Timmons, B. W., Tarnopolsky, M. A., and Bar-Or, O. (2006). Sex-based effects on the distribution of NK cell subsets in response to exercise and carbohydrate intake in adolescents. *Journal of Applied Physiology*, 100(5), 1513-1519.

Timmons, B. W., and Cieslak, T. (2008). Human natural killer cell subsets and acute exercise: a brief review. *Exercise immunology review*, 14(905), 8-23.

Tiollier, E., Gomez-Merino, D., Burnat, P., et al. (2005). Intense training: mucosal immunity and incidence of respiratory infections. *European journal of applied physiology*, 93(4), 421-428.

Tiollier, E., Chennaoui, M., Gomez-Merino, D., et al. (2007). Effect of a probiotics supplementation on respiratory infections and immune and hormonal parameters during intense military training. *Military medicine*, 172(9), 1006-1011.

Tobita, K., Yakana, H. and Otani, H. (2010) Lactobacillus crispatus k-11 enhances intestinal immune functions in C#H/HeN mice. *Journal of nutritional science and vitaminology* 56, 441–445.

Tomás, M., Elosua, R., Sentí, M., et al. (2002). Paraoxonase1-192 polymorphism modulates the effects of regular and acute exercise on paraoxonase1 activity. *Journal of lipid research*, 43(5), 713-720.

Tomasi, T. B. and Plaut, A. G. Humoral aspects of mucosal immunity. In: *Advances in Host Defense Mechanisms*. J. I. Gallin, A. and S. Fauci, ed.: Raven Press, New York, USA, 1985, pp. 31–61.

Turróni, F., Ventura, M., Buttó, L. F., et al. (2014). Molecular dialogue between the human gut microbiota and the host: a Lactobacillus and Bifidobacterium perspective. *Cellular and molecular life sciences*, 71(2), 183-203.

Välimäki, I. A., Vuorimaa, T., Ahotupa, M., et al. (2012). Decreased training volume and increased carbohydrate intake increases oxidized LDL levels. *International journal of sports medicine*, 33, 291-296.

van Baarlen, P., Troost, F., van der Meer, C., et al. (2011). Human mucosal in vivo transcriptome responses to three lactobacilli indicate how probiotics may modulate human cellular pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*, 4562-4569.

van Baarlen, P., Wells, J. M., and Kleerebezem, M. (2013). Regulation of intestinal homeostasis and immunity with probiotic lactobacilli. *Trends in immunology*, *34*(5), 208-215.

van Wijck, K., Lenaerts, K., Grootjans, J., et al. (2012). Physiology and pathophysiology of splanchnic hypoperfusion and intestinal injury during exercise: strategies for evaluation and prevention. *American journal of physiology-gastrointestinal and liver physiology*, *303*(2), G155-G168.

Vasiljevic, T., and Shah, N. P. (2008). Probiotics—from Metchnikoff to bioactives. *International dairy journal*, *18*(7), 714-728.

Vieira, V. J., Valentine, R. J., Wilund, K. R., et al. (2009). Effects of diet and exercise on metabolic disturbances in high-fat diet-fed mice. *Cytokine*, *46*(3), 339-345.

Vieira, V. J., Valentine, R. J., Wilund, K. R., et al. (2009). Effects of exercise and low-fat diet on adipose tissue inflammation and metabolic complications in obese mice. *American journal of physiology-endocrinology and metabolism*, *296*(5), E1164-E1171.

Volman, J. J., Ramakers, J. D., and Plat, J. (2008). Dietary modulation of immune function by β -glucans. *Physiology and behavior*, *94*(2), 276-284.

Walsh, N. P., Gleeson, M., Shephard, R. J., et al. (2011). Position statement part one: immune function and exercise. *Exercise immunology review*, *17*, 6-63.

Walsh, N. P., and Oliver, S. J. (2016). Exercise, immune function and respiratory infection: An update on the influence of training and environmental stress. *Immunology and cell biology*, *94*(2), 132-139.

Wang, J., Song, H., Tang, X., et al. (2012). Effect of exercise training intensity on murine T-regulatory cells and vaccination response. *Scandinavian journal of medicine and science in sports*, *22*(5), 643-652.

- Wang, Y., Gao, L., Zhang, Y. H., et al. (2014). Efficacy of probiotic therapy in full-term infants with critical illness. *Asia pacific journal of clinical nutritiom*, 23(4), 575-80.
- Weiner, H. L., da Cunha, A. P., Quintana, F., et al. (2011). Oral tolerance. *Immunology review*, 241, 241–59.
- Welliver, R. C. and Ogra, P. L. (1988). Immunology of respiratory viral infections. *Annual Review of Medicine*, 39, 147-162.
- West, N. P., Pyne, D. B., Peake, J. M., et al. (2009). Probiotics, immunity and exercise: a review. *Exerc Immunol Rev*, 15(107), e26.
- West, N. P., Pyne, D. B., Cripps, A. W., et al. (2011). Lactobacillus fermentum (PCC®) supplementation and gastrointestinal and respiratory-tract illness symptoms: a randomised control trial in athletes. *Nutrition journal*, 10(1), 1.
- West, N. P., Horn, P. L., Pyne, D. B., et al. (2014). Probiotic supplementation for respiratory and gastrointestinal illness symptoms in healthy physically active individuals. *Clinical nutrition*, 33(4), 581-587.
- West, N. P., Horn, P. L., Pyne, D. B., et al. (2016). Probiotic supplementation has little effect on peripheral blood regulatory T-cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*.
- Witard, O. C., Turner, J. E., Jackman, S. R., et al. (2014). High dietary protein restores overreaching induced impairments in leukocyte trafficking and reduces the incidence of upper respiratory tract infection in elite cyclists. *Brain, behavior, and immunity*, 39, 211-219.
- Wong, J. M., De Souza, R., Kendall, C. W., et al. (2006). Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *Journal of clinical gastroenterology*, 40(3), 235-243.
- Wostmann, B. S., Larkin, C., Moriarty, A., et al. (1983). Dietary intake, energy metabolism, and excretory losses of adult male germfree Wistar rats. *Laboratory animal science*, 33(1), 46-50.
- Yu, L. C., Wang, J. T., Wei, S. C., et al. (2012). Host-microbial interactions and regulation of intestinal epithelial barrier function: From physiology to pathology. *World journal of gastrointest pathophysiology*, 3(1), 27-43.

Zhang, F. J., Sun, Z. Y., and Cheng, B. L. (2008). Effects of probiotics supplementation on intestinal symptoms and immunity of preterm infants. *Journal of Shandong University (Health Sciences)*, *11*, 015.

Biografija

Danica Michaličkova, devojčaki Marinković, rođena je 30. 3. 1988. godine u Nišu, gde je završila osnovnu školu i Gimnaziju „Bora Stanković“. Na Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu, smer magistar farmacije - master, upisala se 2007, a završila je 2012. godine sa prosečnom ocenom 9,12 i ocenom 10 za završni rad. Iste godine upisala se na doktorske studije na Farmaceutskom fakultetu, modul Bromatologija. Tokom pohađanja gimnazije i osnovnih studija bila je stipendista Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj.

Od oktobra 2013. do januara 2016. godine radila je na Katedri za bromatologiju u zvanju stručni saradnik. Od aprila do juna 2016. bila je volonter na Endokrinološkom institutu u Pragu, na Odeljenju za steroide i proteohormone, a od septembra 2016. radi na Institutu za farmakologiju na Prvom medicinskom fakultetu Karlovog univerziteta u Pragu u zvanju naučni radnik. Marta 2017. godine Danica Michaličkova je izabrana u zvanje odborni asistent.

Danica Michaličkova je autor dva originalna rada objavljena u vodećim časopisima od međunarodnog značaja i oba su uključena u doktorsku disertaciju. Koautor je i rada u časopisu od nacionalnog značaja kao i 9 saopštenja na međunarodnim i domaćim naučnim skupovima. Takođe, koautor je knjige *Marinković, D., Anđelković, M., Vukašinović-Vesić, M., Dorđević, B., Stojanović, R., Milinković, Z.; urednik Dikić, N. Probiotici u sportu. Udruženje za medicine sporta Srbije. Beograd, 2015.*

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Даница Михаличкова

Број индекса 38/12

Изјављујем

да је докторска дисертација поднасловом

УТИЦАЈ СУПЛЕМЕНТАЦИЈЕ СОЈЕМ LACTOBACILLUS HELVETICUS L10 НА
МАРКЕРЕ ИМУНОЛОШКОГ И ОКСИДАТИВНОГ СТАТУСА ВРХУНСКИХ
СПОРТИСТА

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени;
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 8.4.2017.

Даница Михаличкова

Изјава о истоветности штампане и
електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Даница Михаличкова

Број индекса 38/12

Студијски програм докторске академске студије – модул броматологија

Наслов рада:

УТИЦАЈ СУПЛЕМЕНТАЦИЈЕ СОЈЕМ *LACTOBACILLUS HELVETICUS* L10 НА
МАРКЕРЕ ИМУНОЛОШКОГ И ОКСИДАТИВНОГ СТАТУСА ВРХУНСКИХ
СПОРТИСТА

Ментор dr sc. Брижита Ђорђевић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањења у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 8. 4. 2017.

Даница Михаличкова

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

УТИЦАЈ СУПЛЕМЕНТАЦИЈЕ СОЈЕМ *LACTOBACILLUS HELVETICUS* L10 НА
МАРКЕРЕ ИМУНОЛОШКОГ И ОКСИДАТИВНОГ СТАТУСА ВРХУНСКИХ СПОРТИСТА

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.


Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CCBY)
2. Ауторство – некомерцијално (CCBY-NC)
- 3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CCBY-NC-ND)**
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CCBY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CCBY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CCBY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 8. 4. 2017.



1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребудела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћењадела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребудела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореногкода.